
Technische Universität Dresden

Fakultät Umweltwissenschaften

Thema der Dissertation:

Entwicklung und Anwendung molekularbiologischer Methoden zur Identifizierung fäkaler Eintragsquellen in Rohwasser (Microbial Source Tracking)

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Vorgelegt von:

Dipl.-Ing. (FH) Claudia Stange

geboren am 08.12.1978

in Bretten

- | | |
|-----------|---|
| Gutachter | Prof. Dr. rer. nat. habil. Thomas U. Berendonk, Technische Universität Dresden, Fakultät Umweltwissenschaften, Institut für Hydrobiologie, Professur für Limnologie |
| Gutachter | Prof. Dr. rer. nat. Andreas Tiehm, DVGW-Technologiezentrum Wasser, Abteilung Wassermikrobiologie |
| Gutachter | AOR PD Dr. Michael Seidel, Technische Universität München, Fakultät für Chemie, Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie |

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 29.03.2021

Verteidigung: 23.09.2021

Übereinstimmungserklärung

Die Übereinstimmung dieses Exemplars mit dem Original der Dissertation zum Thema:

„Entwicklung und Anwendung molekularbiologischer Methoden zur Identifizierung fäkaler Eintragsquellen in Rohwasser (Microbial Source Tracking)“

wird hiermit bestätigt.

Karlsruhe, 7.10.2021

Ort, Datum

Claudia Stange

Unterschrift (Claudia Stange)

ZUSAMMENFASSUNG

Der Nachweis von Fäkalindikatorbakterien (wie z. B. *E. coli* oder intestinale Enterokokken) gibt zwar einen Hinweis auf eine fäkale Belastung im Gewässer, erlaubt jedoch keinen Rückschluss auf den Ursprung.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden verschiedene Methoden zur Identifizierung von fäkalen Eintragsquellen (Microbial Source Tracking, MST) geprüft. Hierzu zählen Kultur-basierte Verfahren, wie der Nachweis von Toxingenen in *E. coli*-Isolaten, und Kultur-unabhängige Methoden wie die Denaturierende-Gradienten-Gelelektrophorese oder der Nachweis von DNA-Abschnitten, die spezifisch für menschlichen oder tierischen Kot sind.

Die Untersuchung von *E. coli*-Isolaten aus der aquatischen Umwelt auf Toxingene erwies sich in Hinblick auf die Identifizierung von fäkalen Eintragsquellen als nicht zielführend. Problematisch war neben dem hohen Zeitaufwand vor allem das seltene Vorkommen dieser Virulenzfaktoren im untersuchten Gewässer. Enteropathogene *E. coli*-Bakterien werden nur von infizierten Wirten abgegeben, daher ist der Nachweis der Virulenzgene in Gewässern stark eingeschränkt.

Im nächsten Schritt wurden Datenbank-unabhängige Verfahren für die Untersuchungen im Einzugsgebietsmaßstab etabliert. Methoden zur spezifischen Detektion von fäkalen Einträgen durch Menschen, Rinder (Wiederkäuer), Schweine, Hunde, Schafe, Hühner und Pferde standen anschließend für die Identifizierung von fäkalen Einträgen in verschiedenen Einzugsgebieten zur Verfügung. Die Ergebnisse der Untersuchungen belegen, dass mit den etablierten MST-Verfahren sehr empfindliche und spezifische Werkzeuge für die Identifizierung von fäkalen Einträgen im Einzugsgebietsmaßstab zur Verfügung stehen. Durch die Untersuchung von Wasserproben auf das Vorkommen von MST-Markern konnten Aussagen über Auftreten und Stärke fäkaler Belastungen in städtisch und ländlich geprägten Einzugsgebieten gemacht werden. Kontaminationsquellen wurden identifiziert und Vorschläge für gezielte Managementmaßnahmen im Einzugsgebiet abgeleitet. Des Weiteren wurde die MST-Verfahren erfolgreich dazu genutzt Erkenntnisse über den Ursprung von Antibiotikaresistenzgenen im Tai-See (China) zu gewinnen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die MST-Methoden basierend auf wirtsspezifischen Markern für den Einsatz in der Praxis geeignet sind. Zusammen mit der Betrachtung der örtlichen Gegebenheiten ist MST ein hilfreiches und kostengünstiges Werkzeug bei der Ursachenforschung und der Ermittlung der Herkunft fäkaler Belastungen in der aquatischen Umwelt. Damit trägt es wesentlich zu einer zielorientierten Bewirtschaftung des Gewässers bei.

ABSTRACT

Although evidence of fecal indicator bacteria (such as *E. coli* or intestinal enterococci) indicates fecal contamination in the aquatic environment, it does not allow any conclusion regarding the origin of the pollution. With the use of so-called microbial source tracking methods it is possible to trace the origin of such contaminations.

In this dissertation, various microbial source tracking methods were tested. These include culture-based methods such as the detection of toxin genes in *E. coli* isolates, and culture-independent methods such as denaturing gradient gel electrophoresis or the detection of defined DNA sections specific for human or animal feces using quantitative real-time PCR.

Analysis of *E. coli* isolates from the aquatic environment on toxin genes proved to be ineffective in identifying fecal sources of input. In addition to the high effort of time, the problem was the rare occurrence of these virulence factors in the examined water. Enteropathogenic *E. coli* bacteria carry virulence genes which are only released from infected hosts. Therefore, the detection of virulence genes in weakly to moderately contaminated waters is severely limited.

In the next step, culture-independent PCR procedures were established. Afterwards, methods for the specific detection of fecal entries by humans, cattle (ruminants), pigs, dogs, sheep, chickens and horses were available for the identification of fecal entries in various catchment areas. The results of these investigations show that established MST methods provide very sensitive and specific tools for the identification of fecal entries at the catchment scale. Investigation using culture-independent methods provided information on the origin and severity of fecal pollutions in urban and rural catchment areas. Origins of contaminations were identified and concrete recommendations for management action plans in the catchment area were derived. Overall, the results show the potential and the suitability for practical application of molecular biological microbial source tracking methods. Furthermore, the MST methods have been successfully used to gain knowledge about the origin of antibiotic resistance genes in Tai Lake (China).

The results of this thesis show that MST methods based on host-specific markers are suitable for practical use. Together with the consideration of local conditions, MST is a helpful and cost-effective tool for causal research and the determination of the origin of fecal contamination in the aquatic environment. Thus it contributes significantly to a goal-oriented management of the water body.

DANKSAGUNG

Für die Übernahme der Korrektur und Betreuung möchte ich mich bei Prof. Dr. T. U. Berendonk und Prof. Dr. A. Tiehm, der mir dieses Thema zur Verfügung gestellt hat, bedanken.

Mein Dank gilt meinen Kollegen am Technologiezentrum Wasser in Karlsruhe. Ohne ihre ständige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung wäre diese Arbeit kaum möglich gewesen. Ich konnte mich stets mit meinen Fragen an sie wenden. Vielen Dank für alles!

Im Speziellen gilt mein Dank Carmen Kraffert, Viola Simon und Carolin Schweikart, die viele PCR-Messungen für mich durchgeführt haben.

An dieser Stelle möchte ich all denen Danken, die mich durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung durch alle Höhen und Tiefen begleitet und somit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere meiner Familie und meinem Ehemann Manuel. Danke, dass Ihr immer an mich geglaubt habt.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	VI
FORMELVERZEICHNIS	VIII
1. HINTERGRUND	1
1.1 INDIKATORORGANISMEN	2
1.2 SOURCE TRACKING-METHODEN	3
1.2.1 <i>Datenbank-abhängige Methoden</i>	6
1.2.2 <i>Datenbank-unabhängige Methoden</i>	13
1.2.3 <i>Source Tracking mit chemischen Substanzen</i>	31
1.3 ANTIBIOTIKARESISTENZEN IN DER UMWELT.....	32
2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	35
3. MATERIAL UND METHODEN	37
3.1 MONITORING MIKROBIOLOGISCHER PARAMETER – KULTURVERFAHREN	37
3.1.1 <i>Coliforme Bakterien und Escherichia coli</i>	37
3.1.2 <i>Enterokokken</i>	38
3.1.3 <i>Clostridium perfringens</i> -Sporen.....	38
3.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE ANALYTIK	39
3.2.1 <i>PCR-Untersuchung von E. coli-Isolaten auf Virulenzgene</i>	39
3.2.2 <i>Molekularbiologische Untersuchung von Wasserproben</i>	40
3.3 UNTERSUCHUNGEN ZUR ERFASSUNG DER CHARAKTERISTIKA DER KULTUR-UNABHÄNGIGEN MICROBIAL SOURCE TRACKING-VERFAHREN	47
3.3.1 <i>Nachweisempfindlichkeit</i>	47
3.3.2 <i>Spezifität und Sensitivität</i>	47
3.3.3 <i>Charakterisierung möglicher Eintragsquellen</i>	48
3.3.4 <i>Untersuchungen zur Stabilität von Microbial Source Tracking-Markern</i>	49
3.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG	50
4. BESCHREIBUNG DER UNTERSUCHUNGSGEBIETE	51
4.1 RHEIN	51
4.2 GALLUSQUELLE	51
4.3 EINZUGSGEBIETE DER BERLINER WASSERBETRIEBE	54
4.3.1 <i>Wasserwerk Tiefwerder</i>	54
4.3.2 <i>Wasserwerk Kaulsdorf</i>	56
4.4 EINZUGSGEBIETE DER WSW ENERGIE & WASSER AG	57
4.4.1 <i>Talsperre Herbrinhausen</i>	57
4.4.2 <i>Talsperre Kerspe</i>	58
4.5 TAI-SEE	59
4.6 VERGLEICH DER UNTERSUCHUNGSGEBIETE	61
5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	63
5.1 NACHWEIS VON VIRULENZGENEN ALS MICROBIAL SOURCE TRACKING-WERKZEUG.....	64
5.2 DATENBANK-UNABHÄNGIGE UND KULTUR-UNABHÄNGIGE MICROBIAL SOURCE TRACKING-VERFAHREN	66

5.2.1	<i>Etablierung Datenbank-unabhängiger und Kultur-unabhängiger Microbial Source Tracking-Verfahren</i>	66
5.2.2	<i>Nachweisempfindlichkeit</i>	74
5.2.3	<i>Spezifität und Sensitivität der Marker</i>	77
5.2.4	<i>Charakterisierung möglicher Eintragsquellen</i>	79
5.2.5	<i>Stabilität von Microbial Source Tracking-Markern</i>	82
5.3	UNTERSUCHUNG IM EINZUGSGEBIETSMASSTAB	90
5.3.1	<i>Gallusquelle</i>	90
5.3.2	<i>Wasserwerke Tiefwerder und Kaulsdorf</i>	103
5.3.3	<i>Talsperren Herbrinhausen und Kerspe</i>	112
5.4	EINSATZ VON MICROBIAL SOURCE TRACKING-METHODEN ZUR IDENTIFIZIERUNG DER HERKUNFT VON ANTIBIOTIKARESISTENZEN	114
6.	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	121
7.	EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	126
8.	FINANZIELLE FÖRDERUNG	128
9.	LITERATURVERZEICHNIS	129
10.	ANHANG	155
10.1	LISTE DER GERÄTE UND MATERIALIEN.....	155
10.1.1	<i>Geräte</i>	155
10.1.2	<i>Kits, Reagenzien und Chemikalien</i>	156
10.1.3	<i>Verbrauchsmaterial</i>	157
10.1.4	<i>Medien und Lösungen</i>	158
10.2	UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE	160

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism (Amplifizierter Fragment-Längen-Polymorphismus)
AP-PCR	Arbitrarily Primed PCR (arbiträr gepimte PCR)
ARA	Antibiotikaresistenz-Analyse
ARP	Antibiotikaresistenz-Profilerstellung
AtAdVs	Atadenovirus
BEVs	Boviner Enterovirus
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BNoVs	Boviner Norovirus
BPyVs	Boviner Polyomavirus
ChPVs	Hühner-infizierender Parvovirus
CSU	Carbon-Source Utilization Profiling (Biochemischer Fingerabdruck)
CT	Threshold Cycle
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (Denaturierende-Gradienten-Gelelektrophorese)
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DOC	Dissolved Organic Carbon (Gelöster organischer Kohlenstoff)
DVGW	Deutscher Verein des Gas- und Wasserfaches
EAEC	Enteraggregative <i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
EPEC	Enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (Enterobakterielle repetitive intergenische Konsensus)
ETEC	Enterotoxische <i>Escherichia coli</i>
HAdVs	Humaner Adenovirus
HEV	Humaner Enterovirus
HPyVs	Humaner Polyomavirus
ISR	Intergenische Spacer-Region
KBE	Kolonie-bildende Einheit
LD	Limit of Detection (Nachweisgrenze)
LH-RFLP	Length Heterogeneity Restriction Fragment Length Polymorphisms
LQ	Limit of Quantification (Bestimmungsgrenze)
MALDI-TOF-MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektroskopie)
MPN	Most Probable Number
MST	Microbial Source Tracking
mtDNA	Mitochondriale DNA
NGS	Next Generation Sequencing
OADVs	Oviner Adenovirus
ONoVs	Oviner Norovirus
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis (Pulsfeld-Gelelektrophorese)
PLFA	Phospholipid Fatty Acid Analysis (Phospholipid-Fettsäure-Analyse)
PTVs	Porziner Teschovirus
qPCR	Quantitative real-time PCR
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA (zufällig vervielfältigte polymorphe DNA)
Rep-PCR	PCR-Amplifikation repetitiver chromosomaler Elemente
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
SFB	Sorbitol-fermentierenden Bifidobakterien
T-RFLP	Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms
TrinkWV	Trinkwasserverordnung
TuPVs	Truthähne-infizierender Parvovirus
UBA	Umweltbundesamt
US EPA	United States Environmental Protection Agency
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1:	Erfassung fäkaler Einträge über das Indikatorprinzip.....	2
Abbildung 1.2:	Überblick über die verschiedenen Gruppen der Microbial Source Tracking-Methoden.	4
Abbildung 1.3:	Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion. Die Schritte 1 bis 4 werden in einer Schleife etwa 30 bis 50-mal wiederholt. In jedem Zyklus verdoppelt sich die DNA Menge des gesuchten Fragmentes. Durch die Vervielfältigung wird die DNA detektierbar.	5
Abbildung 1.4:	Überblick der Datenbank-abhängigen Microbial Source Tracking-Methoden.	7
Abbildung 1.5:	Vergleich der mikrobiellen Diversität z. B. im menschlichem Kolon, Maus-Zökum, Ozean und Boden (Quelle: Ley et al. 2006). Darstellung der prozentualen Zusammensetzung in verschiedenen Habitaten.....	14
Abbildung 1.6:	Multiple Eintragsquellen fäkaler Kontaminationen im Wasserkörper (nach Roslev und Bukh 2011).	15
Abbildung 1.7:	Überblick der Datenbank-unabhängigen Microbial Source Tracking-Methoden.	16
Abbildung 3.1:	Kulturnachweis β -Glucuronidase positiver <i>E. coli</i> -Bakterien im Colilert®-18-System der Firma IDEXX Laboratories (links) und im DIN ISO-Verfahren 16649-1 (rechts).	37
Abbildung 3.2:	Kulturnachweis von Enterokokken nach DIN ISO 7899-2.	38
Abbildung 3.3:	Kulturnachweis von <i>Clostridium perfringens</i> nach DIN EN ISO 14189:216-11.	38
Abbildung 3.4:	Schematischer Ablauf der molekularbiologischen Analytik.	41
Abbildung 3.5:	Fluoreszenzzunahme in den Proben mit bekannter Kopienzahl (Standards). Dargestellt sind die eingesetzten Standards (in grün) mit den Konzentrationen (von links nach rechts) 107-101. In schwarz sind die No-Template Kontrollen gezeigt. In rot ist der Schwellenwert/Threshold dargestellt, den die Kurven der Standards im CT-Wert schneiden.	44
Abbildung 3.6:	Beispielhafte Standardkurve eines quantitativen real-time PCR-Laufes.	44
Abbildung 3.7:	Beispielhafte Schmelzkurve eines quantitativen real-time PCR-Laufes.	45
Abbildung 3.8:	Workflow der Herstellung von vektoriellen Standards.	46
Abbildung 3.9:	Batchexperimente zur Stabilität von Microbial Source Tracking-Markern.	49
Abbildung 4.1:	Einzugsgebiet der Gallusquelle (angelehnt an (Auckenthaler und Huggenberger 2003; Birk et al. 2005) mit den möglichen fäkalen Eintragsquellen. (Diese Karte wurde mit Daten von Open Street Map (www.openstreetmap.org) erstellt.)	52
Abbildung 4.2:	Übersicht über die Wasserwerke der Berliner Wasserbetriebe (Quelle: http://www.bwb.de/content/language1/html/941.php).	54
Abbildung 4.3:	Einzugsgebiet des Wasserwerks Tiefwerder mit den Brunnengalerien und den Wasserschutzzonen 1 (rot) und 2 (orange). Die beprobten Oberflächenwassermessstellen im Zu- und Abstrom von Schildhorn sind in braun markiert und die Grundwasserpegel in blau. (Diese Karte wurde mit Daten von Open Street Map (www.openstreetmap.org) erstellt.)	55
Abbildung 4.4:	Lage der Brunnengalerien mit Schutzzonen 1 (rot) und 2 (gelb) des Wasserwerks Kaulsdorf Die beprobten Pegel sind blau markiert. (Diese Karte wurde mit Daten von Open Street Map (www.openstreetmap.org) erstellt.)	57
Abbildung 4.5:	Herbringhauser Trinkwassertalsperre mit den beprobten Bereichen (braun) und der Wasserschutzzone 1 (rot). (Diese Karte wurde mit Daten von Open Street Map (www.openstreetmap.org) erstellt.)	58
Abbildung 4.6:	Einzugsgebiet Talsperre Kerspe mit den beprobten Messstellen (braun) und der Wasserschutzzone 1 (rot). (Die Karte wurde mit Daten von Open Street Map (www.openstreetmap.org) erstellt.).....	59
Abbildung 4.7:	Untersuchte Bereiche des Tai-Sees.....	60
Abbildung 5.1:	Übersicht über die verschiedenen Versuchsphasen.	63
Abbildung 5.2:	Ausgewählte PCR-Ergebnisse der Untersuchung von Abwasser- und Kotproben auf wirtsspezifische Marker. Die Abbildung zeigt Agarosegele mit spezifisch amplifizierten PCR-Produkten (schwarze Banden) in den Spuren der Kotproben. Die erste Gel-Spur zeigt immer eine DNA-Leiter mit DNA-Fragmenten bekannter Größe.....	69
Abbildung 5.3:	Orientierende Untersuchung zur Eignung von Hunde- und Schweine-spezifischen Markern.	72

Abbildung 5.4:	Verhalten von <i>E. coli</i> , Enterokokken und <i>C. perfringens</i> -Sporen über die Versuchsdauer (LD = Nachweisgrenze, limit of detection).....	83
Abbildung 5.5:	Übersicht der Ergebnisse zu den Stabilitätsuntersuchungen.	85
Abbildung 5.6:	Verhältnis Marker/ <i>E. coli</i> in den Untersuchungen zur Stabilität von Microbial Source Tracking-Markern.	89
Abbildung 5.7:	Vergleichende Darstellung der mikrobiologischen Untersuchungsergebnisse und der Trübungsdaten des Rohwassers der Gallusquelle von Januar 2012 bis Juli 2013.....	91
Abbildung 5.8:	Vergleichende Darstellung der mikrobiologischen Untersuchungsergebnisse des Wassers aus dem Regenrückhaltebecken (RÜB) und des Rohwassers der Gallusquelle (maximal gemessener Wert im Folgezeitraum) zu den beiden Ereignissen.	93
Abbildung 5.9:	Darstellung der quantitativen Ergebnisse der Untersuchung auf <i>E. coli</i> , wirtsunspezifische und spezifische <i>Bacteroides</i> sowie mtDNA-Sequenzen für vier ausgewählte Ereignisse an der Gallusquelle.....	95
Abbildung 5.10:	Ergebnis der DGGE-Untersuchungen mit wirtsunspezifischen bakteriellen 16S rDNA-Genabschnitten als Zielsequenz.	97
Abbildung 5.11:	DGGE-Bandenmuster von Proben aus der Gallusquelle unter Einsatz von <i>Bacteroides</i> -Primern. .	98
Abbildung 5.12:	DGGE-Bandenmuster von Proben aus der Gallusquellen und Kotproben unterschiedlichen Ursprungs unter Einsatz von <i>Bacteroides</i> -Primern.....	99
Abbildung 5.13:	Dendrogramm zur Ähnlichkeitsanalyse der DGGE-Bandenmuster von Proben aus der Gallusquelle und Kotproben unterschiedlichen Ursprungs erstellt mit dem Programm PyElph. Die über den Ästen angegebenen Zahlen entsprechen den Astlängen.	100
Abbildung 5.14:	Starkregen Juli 2013: Schüttung, elektrische Leitfähigkeit, Konzentration von Cyclamat (Zirlewagen et al. 2016), <i>E. coli</i> -, Enterokokken-Zahlen und Genkopien der <i>Bacteroides</i> -Marker im Wasser der Gallusquelle.....	102
Abbildung 5.15:	Durchschnittliche Konzentration des unspezifischen und humanspezifischen Markers in Proben aus Havel und Spree.....	109
Abbildung 5.16:	Absolute (oben) und relative (unten) Abundanz der untersuchten Antibiotikaresistenzgene (ARG) in Wasserproben aus verschiedenen Bereichen des Tai-Sees. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen.....	115
Abbildung 5.17:	Absolute (links) und relative (rechts) Abundanzen der untersuchten Antibiotikaresistenzgene in Wasserproben zu den unterschiedlichen Untersuchungszeiträumen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen.....	118
Abbildung 5.18:	Räumliche (links) und zeitliche (rechts) Unterschiede im Nachweis von wirtsunspezifischen, human-, Schweine- und Wiederkäuer-spezifischen Microbial Source Tracking-Markern im Tai-See. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen.....	119

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.1:	Mikrobiologische Anforderungen an Trinkwasser nach der TrinkwV 2001 (KBE= Kolonie-bildende Einheiten).....	3
Tabelle 1.2:	Zusammenfassung ausgewählter Literatur zu Fingerprint-Analysen als Microbial Source Tracking-Werkzeuge.....	22
Tabelle 1.3:	Bacteroidales-basierte PCR-Assays in der Literatur.....	27
Tabelle 1.4:	Tier-assoziierte virale genetische Marker in der Literatur.....	29
Tabelle 1.5:	Überblick über häufig genutzt chemische Indikatoren für die Herkunftsbestimmung.....	32
Tabelle 3.1:	E. coli-Pathotypen und die entsprechenden Virulenzgene.....	40
Tabelle 3.2:	Zusammensetzung der qPCR-Ansätze.....	42
Tabelle 3.3:	Verwendete Primer für die Untersuchungen im Einzugsgebietsmaßstab.....	42
Tabelle 3.4:	PCR-Programme für die verschiedenen Primersysteme. Bei jedem Lauf fand eine initiale Aktivierung der Polymerase (10 min bei 95 °C) statt.....	43
Tabelle 3.5:	Primer, Literaturquellen, Produktgrößen und Annealingtemperaturen für den Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen.....	45
Tabelle 3.6:	Eingesetzte Kotproben zur Untersuchung der Spezifität.....	48
Tabelle 4.1:	Charakteristika der verschiedenen Untersuchungsgebiete.....	62
Tabelle 5.1:	Auftreten von Virulenzgenen in E. coli-Isolaten aus der Umwelt. Vergleich der Ergebnisse aus dieser Studie mit publizierten Daten (- = nicht analysiert).....	64
Tabelle 5.2:	Getestete Primersysteme in Phase 2.....	68
Tabelle 5.3:	Getestete Primersysteme in Phase 3.....	71
Tabelle 5.4:	Verfügbare Microbial Source Tracking-Toolbox.....	74
Tabelle 5.5:	Ergebnisse der Untersuchung zur Nachweisempfindlichkeit mit humanem Abwasser.....	75
Tabelle 5.6:	Ergebnisse der Untersuchung zur Nachweisempfindlichkeit mit Hundekot.....	75
Tabelle 5.7:	Ergebnisse der Untersuchung zur Spezifität und Sensitivität der Bacteroides-basierten Marker....	78
Tabelle 5.8:	Ergebnisse der Untersuchung zur Spezifität und Sensitivität der mitochondrialen DNA-Sequenzen.....	78
Tabelle 5.9:	Ergebnisse der Untersuchung zur Spezifität und Sensitivität im Rahmen anderer Studien.....	79
Tabelle 5.10:	Analysenergebnisse der Untersuchungen zur Charakterisierung von Eintragsquellen (Abwasser).80	
Tabelle 5.11:	Verhältnis Indikatorbakterien und Microbial Source Tracking-Marker zu E. coli in frischen Kotproben (n.b. = nicht bestimmbar).....	81
Tabelle 5.12:	Abbauraten (k), Reduktionzeiten für eine Log-Stufe (T90) und Regressionskoeffizienten (r ²) von E. coli, Enterokokken und den genetischen Markern innerhalb 14 Tagen.....	86
Tabelle 5.13:	Mikrobiologische Untersuchungszeiträume.....	92
Tabelle 5.14:	Ermittelte Konzentrationen der wirtsunspezifischen Bacteroides- und mtDNA Marker (AllBac296f/412r und Umito2-G/-D2) in Proben aus dem Einzugsgebiet Tiefwerder (n.a. = nicht analysiert).....	104
Tabelle 5.15:	Ermittelte Konzentrationen der Indikatorbakterien und wirtsspezifischen Bacteroides-Marker in Proben aus der Unterhavel.....	105
Tabelle 5.16:	Ermittelte Konzentrationen der wirtsspezifischen Bacteroides-Marker in Proben aus der Havel ..	107
Tabelle 5.17:	Ermittelte Konzentrationen der wirtsspezifischen Bacteroides-Marker in Proben aus der Spree..	108
Tabelle 5.18:	Ermittelte Konzentrationen der wirtsunspezifischen Bacteroides- und mtDNA Marker in Proben aus dem Einzugsgebiet Kaulsdorf.....	109
Tabelle 5.19:	Ermittelte Konzentrationen der Indikatorbakterien (ermittelt vom LAGeSo) und Bacteroides-Marker in Proben aus der Brunnengalerie Kaulsdorf und dem Habermannsee.....	110
Tabelle 5.20:	Ermittelte Konzentrationen der Bacteroides-Marker für Proben aus dem Einzugsgebiet Herbringhausen.....	112

Tabelle 5.21:	Ermittelte Konzentrationen der Bacteroides-Marker für Proben aus dem Einzugsgebiet Kerspe..	113
Tabelle 6.1:	Microbial Source Tracking-Methoden, die im Rahmen dieser Arbeit etabliert wurden.	122
Tabelle 6.2:	Stärke der fäkalen Belastung der unterschiedlichen Einzugsgebiete (+++ stark beeinflusst, ++ beeinflusst, + schwach beeinflusst, - nicht beeinflusst)	124
Tabelle 10.1:	Auflistung der verwendeten Geräte.	155
Tabelle 10.2:	Auflistung der verwendeten Kits, Reagenzien und Chemikalien.	156
Tabelle 10.3:	Auflistung der Verbrauchsmaterialien.....	157
Tabelle 10.4:	Herstellung von LAXI-Medium.....	158
Tabelle 10.5:	Herstellung von SOC-Medium.....	158
Tabelle 10.6:	Verwendete Trockennährmedien.	158
Tabelle 10.7:	Herstellung von Pepton-Saline-Lösung (PBS).....	158
Tabelle 10.8:	Herstellung es Azid-Phosphatase-Reagenz.....	159
Tabelle 10.9:	Herstellung von 50 x TAE-Puffer.	159
Tabelle 10.10:	Untersuchungsergebnisse zur Spezifität und Sensitivität von Bacteroides-basierten Markern.	160
Tabelle 10.11:	Untersuchungsergebnisse zur Spezifität und Sensitivität von mtDNA-basierten Markern.....	161
Tabelle 10.12:	Darstellung der quantitativen Ergebnisse der Untersuchung der Gallusquelle auf unspezifische und spezifische Bacteroides sowie mtDNA-Sequenzen für den Zeitraum Februar-September 2012 (LQ: Limit of Quantification).....	162
Tabelle 10.13:	Darstellung der quantitativen Ergebnisse der Untersuchung der Gallusquelle auf wirtsunspezifische und spezifische Bacteroides sowie mtDNA-Sequenzen für den Zeitraum September 2012-Mai 2013 (LQ: Limit of Quantification).....	163
Tabelle 10.14:	Darstellung der quantitativen Ergebnisse der Untersuchung der Gallusquelle auf wirtsunspezifische und spezifische Bacteroides sowie mtDNA-Sequenzen für den Zeitraum Juni-Juli 2013 (LQ: Limit of Quantification).	164
Tabelle 10.15:	Antibiotikaresistenzgene im Tai-See im Vergleich mit anderen chinesischen und internationalen Oberflächengewässern. Relative Abundanz ist die Kopienzahl der Antibiotikaresistenzgene normalisiert durch die 16S rRNA Genkopien. (LOQ = limit of quantification, Bestimmungsgrenze).	165

FORMELVERZEICHNIS

Formel 3.1:	Formel zur Berechnung der Abbauraten	50
Formel 3.2:	Formel zur Berechnung von T_{90}	50
Formel 5.1:	Berechnung der Sensitivität	78
Formel 5.2:	Berechnung der Spezifität	78

1. HINTERGRUND

Bei Untersuchungen zur Wasserqualität wird in mikrobiologische sowie chemische Parameter unterschieden. Die mikrobiologischen Analysen umfassen kulturfähige Erreger wie Bakterien, Viren und Protozoen, aber auch neue Parameter wie z. B. Antibiotikaresistenzgene. Für die mikrobiologische Qualität von Rohwasser sind in der Trinkwasserverordnung (TrinkwV) keine Grenzwerte festgelegt. Die Qualität von Rohwasser, welches für die Trinkwassergewinnung genutzt wird, sollte aber weitestgehend bereits Trinkwasserbeschaffenheit haben. Laut TrinkwV ist Rohwasser, bei dem eine mikrobielle Belastung nicht sicher ausgeschlossen werden kann, entsprechend aufzubereiten. Falls erforderlich, muss die Aufbereitung eine Desinfektion umfassen.

Der Schutz der Wassereinzugsgebiete ist eine wesentliche Voraussetzung für eine sichere und qualitativ hochwertige Trinkwasserversorgung (Water Safety Plan; WHO, 2017). Je geringer die genutzten Gewässer belastet sind, desto sicherer ist der Betrieb der Anlagen zur Gewinnung und Aufbereitung. Aus diesem Grund ist es wichtig, eine mikrobielle Belastung des Rohwassers zu erfassen und zu vermeiden.

Die derzeitige Überwachung der mikrobiologischen Wasserqualität beruht auf dem Nachweis von Indikatorbakterien. Fäkalindikatorbakterien werden von Menschen und warmblütigen Tieren in hohen Konzentrationen ausgeschieden (Kavka und Poetsch, 2002) und überleben in aquatischen Systemen, abhängig von den Umweltbedingungen eine bestimmte Zeit (Tage bis Monate). Als sehr verlässliche Indikatoren für fäkale Verunreinigungen im Rohwasser haben sich insbesondere *Escherichia coli* und Enterokokken bewährt.

Die Implementierung von effizienten und kostengünstigen Maßnahmen zur Verbesserung der mikrobiologischen Wasserqualität erfordert die Bestimmung der Herkunft und des Ausmaßes fäkaler Verunreinigungen. Je mehr Informationen über das Einzugsgebiet sowie die fäkalen Verunreinigungen vorliegen, umso gezielter können administrative oder technische Maßnahmen ergriffen oder der Verzicht auf Maßnahmen begründet werden. Ziel muss es hierbei sein, die technischen Maßnahmen zur Aufbereitung maßvoll zu halten.

Die Erfassung von Indikatorbakterien ermöglicht den Nachweis von Beeinträchtigungen der Wasserqualität durch Fäkaleinträge, gibt jedoch keinen Aufschluss über die Herkunft der Kontamination. Neue, vorwiegend molekularbiologische Methoden haben das Potenzial, die Herkunft von Fäkaleinträgen möglichen Quellen zuzuordnen. Diese Methoden werden auch unter dem Begriff Microbial Source Tracking (MST) zusammengefasst.

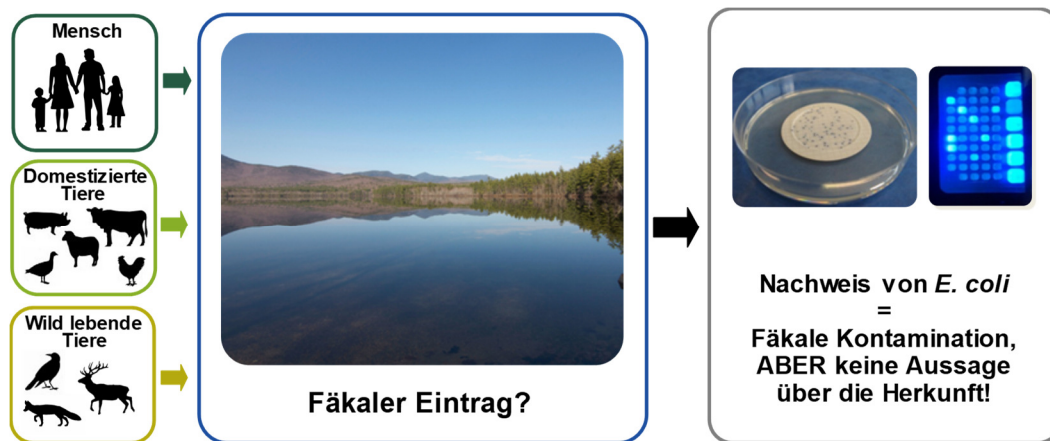


Abbildung 1.1: Erfassung fäkaler Einträge über das Indikatorprinzip.

1.1 Indikatororganismen

Indikatororganismen sind in der Regel apathogene Organismen, die das mögliche Vorkommen von pathogenen Organismen anzeigen sollen. Geläufige Indikatoren sind beispielsweise *E. coli* und Enterokokken als Nachweis für fäkalen Verunreinigungen und somit einen möglichen Eintrag von Pathogenen aus dem Intestinaltrakt. Auch das sporenbildende Bakterium *Clostridium perfringens* wird seit vielen Jahren als Indikator genutzt. Aufgrund seiner hohen Stabilität in der Umwelt dient es als Surrogatparameter für *Cryptosporidium* Oozysten und pathogene Viren (Schijven et al., 2003).

In den WHO-Guidelines for Drinking Water Quality sind Kriterien festgehalten, die Indikatororganismen möglichst erfüllen sollen. Indikatororganismen sollten den gleichen Ursprung haben wie pathogene Organismen, aber zugleich in deutlich größeren Konzentrationen vorkommen als diese. Hinzu kommt eine gleiche bis längere Überlebensdauer in der Umwelt. Ein Indikator sollte, um das Kriterium der Zuverlässigkeit zu erfüllen, resistenter und unempfindlicher gegenüber Verfahrensschritten sein als Pathogene. Um die Sicherheit im Umgang mit dem Referenzorganismus zu ermöglichen, sollte dieser selbst nicht pathogen sein. Ein wichtiger Aspekt für die universelle Einsetzbarkeit ist, dass der Nachweis des Indikators einfach und kostengünstig ist (World Health Organisation (WHO), 2011).

In Deutschland wird die Qualität des Trinkwassers durch die Trinkwasserverordnung geregelt. In dieser sind Untersuchungen und Grenzwerte angegeben, die zur Qualitätssicherung des Wassers dienen. *E. coli*, fäkale Coliforme, intestinale Enterokokken und *C. perfringens* sind als Standardparameter zur Untersuchung der Qualität genannt, wobei *C. perfringens* als Indikator nur bei Rohwasser mit Oberflächenwassereinfluss untersucht werden muss (Trinkwasserverordnung (TrinkwV), 2001). Zusätzlich zu den genannten Bakterien werden auch allgemein die Koloniezahlen bei 22 °C und bei 36 °C erfasst. Die Grenzwerte sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 1.1: Mikrobiologische Anforderungen an Trinkwasser nach der TrinkwV 2001 (KBE= Kolonie-bildende Einheiten).

Parameter	Grenzwert
Koloniezahlen bei 36 °C	100 KBE/mL
Koloniezahlen bei 22 °C	100 KBE /mL
<i>Escherichia coli</i>	0 KBE /100 mL
Coliforme Bakterien	0 KBE /100 mL
Intestinale Enterokokken	0 KBE /100 mL
<i>Clostridium perfringens</i>	0 KBE /100 mL

1.2 Source Tracking-Methoden

Frühe Versuche, fäkale Eintragsquellen zu identifizieren basieren auf der Ermittlung des Verhältnisses von fäkalen coliformen Bakterien und fäkalen Streptokokken (Geldreich et al., 1968; Geldreich und Kenner, 1969; Geldreich und Litsky, 1976). Es ist heute weithin akzeptiert, dass dieser Ansatz keine genaue Unterscheidung zwischen menschlichen und tierischen Quellen zulässt. Die zur Einordnung der Quellen verwendeten Verhältnisse haben keine einheitliche Gültigkeit für verschiedene Tiere. Die Variabilität der Überlebensraten von fäkalen Coliformen und fäkalen Streptokokken haben einen großen Einfluss auf das Verhältnis, insbesondere wenn eine zeitliche Komponente hinzukommt.

In jüngerer Zeit wurde eine Vielzahl von mikrobiologischen Ansätzen zur Identifizierung der Herkunft fäkaler Verschmutzungen in natürlichen Gewässern verfolgt. Generell unterscheidet man diese Source Tracking-Verfahren in Datenbank-abhängige und Datenbank-unabhängige Methoden. Die Datenbank-abhängigen Methoden erfordern die Erstellung von Datenbanken zu genotypischen oder phänotypischen Charakteristika von Bakterienstämmen, die aus möglichen fäkalen Eintragsquellen isoliert werden. Die Charakteristika von Bakterienstämmen, die aus dem kontaminierten Gewässer isoliert wurden, werden mit diesen Datenbanken verglichen und eingeordnet. Für diese Untersuchung werden meist klassische Indikatorbakterien wie *E. coli* und Enterokokken herangezogen.

Die neueren Datenbank-unabhängigen Methoden sind bis auf einzelne Ausnahmen auch Kultur-unabhängige Methoden. Dies ist möglich, da zur Identifikation der Kontaminationsquelle spezifische, wirtsabhängige genetische Marker verwendet werden. Aus diesem Grund basieren die meisten verfügbaren Methoden auf Endpunkt-PCR- und quantitativer real-time PCR (qPCR)-Verfahren. Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Etablierung und Anwendung solcher Datenbank-unabhängiger Methoden (siehe Abbildung 1.2)

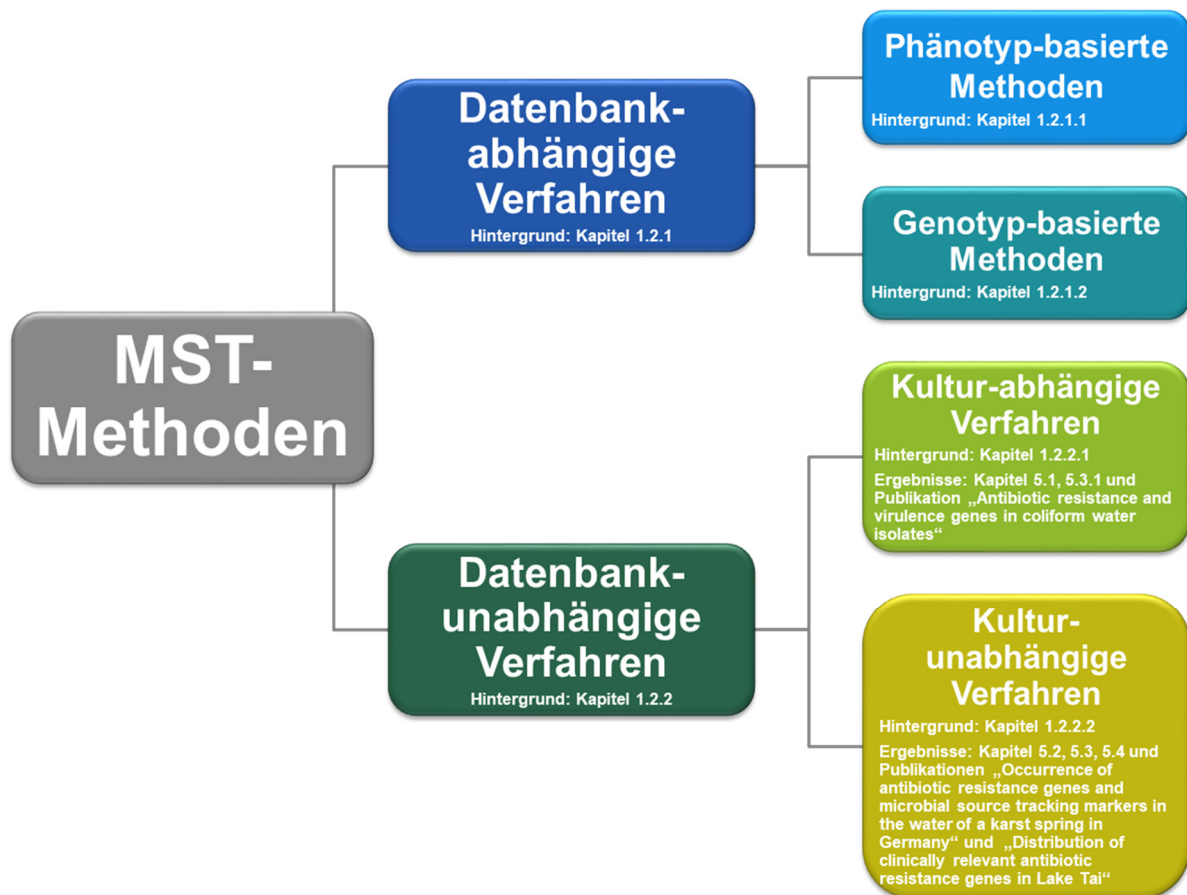


Abbildung 1.2: Überblick über die verschiedenen Gruppen der Microbial Source Tracking-Methoden.

Die PCR ist eine *in vitro* Technik, mit der gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen flankiert werden, vervielfältigt werden können. Sie stellt ein zyklisches Verfahren dar, bei dem die Anzahl der DNA-Kopien in jeder Runde verdoppelt wird. Um die DNA mit Hilfe der PCR amplifizieren zu können, benötigt man zwei Oligonukleotide, sogenannte Primer, die gegenläufig an den komplementären DNA-Strang mit bekannter Sequenz binden. In jedem PCR-Zyklus werden die Schritte Denaturierung (Trennung der doppelsträngigen DNA durch Erhitzen), Annealing (Anlagerung der Primer an die komplementären Sequenzen) und Elongation (Verlängerung der Primer durch das Enzym DNA-Polymerase) durchlaufen. Insgesamt kann die Reaktion 30-50 Zyklen lang bei exponentieller Zunahme der DNA-Menge fortgesetzt werden (siehe Abbildung 1.3).

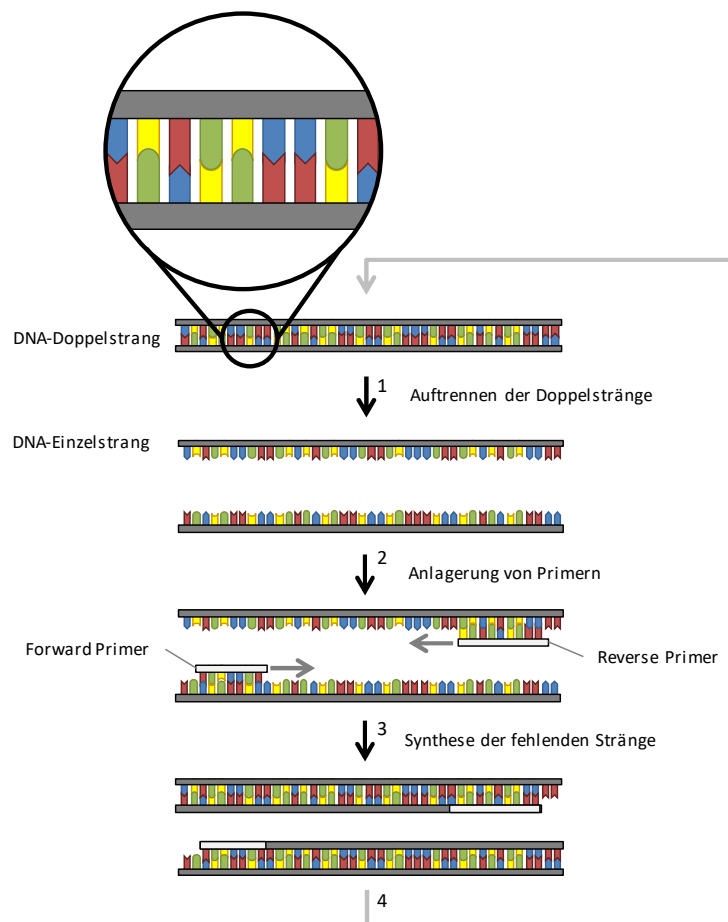


Abbildung 1.3: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion. Die Schritte 1 bis 4 werden in einer Schleife etwa 30 bis 50-mal wiederholt. In jedem Zyklus verdoppelt sich die DNA Menge des gesuchten Fragmentes. Durch die Vervielfältigung wird die DNA detektierbar.

Bei Zugabe entsprechender Fluorochrome zu der PCR-Reaktion kann der Amplifikationserfolg über die Messung von laserinduzierten Fluoreszenzsignalen in Echtzeit ermittelt werden (real-time PCR). Die einfachste Möglichkeit zur Erfassung der Amplifikation in Echtzeit stellen DNA-Farbstoffe (wie z. B. SYBR®-Green I) dar. Diese Fluoreszenzfarbstoffe binden an die doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenz dieser Farbstoffe ansteigt. Die Stärke der beim Amplifikationsprozess entstehenden Fluoreszenz ist dabei proportional zur gebildeten DNA-Menge.

Alternativ können auch Sonden, an die Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind (z. B. TaqMan-Sonden), zum Einsatz kommen. Bei den sog. TaqMan-Sonden handelt es sich um für die Ziel-DNA-spezifische Oligonukleotide, die mit zwei Farbstoffen – einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff (z. B. FAM) und einem "Quencher" (z. B. TAMRA) – markiert sind. Sobald die Sonde an die Zielsequenz bindet, wird durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase die Sonde hydrolysiert und somit eine steigende Reporter-Fluoreszenz gemessen. Je mehr Amplikate entstehen, umso stärker wird das Signal des fluoreszierenden Reporterfarbstoffs (Huggett et al., 2005; Nolan et al., 2006).

Um mit Hilfe der Fluoreszenzmessung während der PCR-Zyklen eine Quantifizierung des Ausgangsmaterials durchführen zu können, benötigt man DNA-Standards, die das Amplikon in bekannter Kopienzahl enthalten. Verdünnungen dieser Standards können in die real-time PCR eingesetzt werden, um eine Standardkurve zu ermitteln, anhand derer man die Kopienzahl unbekannter Proben bestimmen kann. Hierzu wird der „Threshold Cycle“ (C_T -Wert) herangezogen, der angibt in welchem Zyklus die Fluoreszenz über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. In diesem Fall spricht man auch von quantitativer real-time PCR (qPCR).

Die nachfolgenden Kapitel sollen einen Überblick über die gängigen Verfahren und Trends im Forschungsbereich MST geben ohne einen Anspruch auf Vollständigkeit zu erheben. Bei der Fülle der verfügbaren Literatur zu MST-Methoden ist es oft schwierig, die Leistungsmerkmale der vorgeschlagenen Methoden zu vergleichen. Insgesamt sind in der Literatur verschiedenste MST-Verfahren publiziert, die z. T. auf sehr unterschiedlichen Detektionstechniken beruhen. Darüber hinaus fehlt es in Studien oft an umfassenden Informationen zur Spezifität und Sensitivität der Methoden oder der Häufigkeit des Zielparameters im Kot verschiedener Verursacher.

1.2.1 Datenbank-abhängige Methoden

Die Datenbank-abhängigen Methoden basieren meist auf der Kultivierung von fäkalen Bakterien und dem Nachweis phänotypischer bzw. biochemischer oder genotypischer bzw. molekularer Eigenschaften einzelner Isolate. Die entstandenen „Muster“ werden mit Datenbanken verglichen, welche Proben bekannten Ursprungs umfassen.

Der Erfolg der Datenbank-abhängigen Methoden zur Identifizierung der Herkunft von fäkalen Verunreinigungen hängt von der Qualität der erstellten Datenbank ab. Insgesamt müssen verschiedene Kriterien bei der Erstellung der Datenbank berücksichtigt werden. Hierzu zählen u. a. die Verteilung der „Muster“ für die potenziellen Quellen sowie die Berücksichtigung aller möglichen Eintragsquellen. Damit der Ursprung der Umwelt-Isolate korrekt ermittelt werden kann, ist es wichtig, dass die Datenbank einen ausreichenden Umfang hat und einen ausreichenden Satz an unterschiedlichen „Mustern“ enthält, die repräsentativ für alle potenziellen Quellen im Wassereinzugsgebiet sind. Die notwendige Größe einer Datenbank hängt von der verwendeten Methode und den verwendeten Organismen ab.

Die geografische Stabilität ist ein weiterer Faktor, der bei der Entwicklung und Nutzung einer Datenbank berücksichtigt werden muss. Allerdings sind nur wenige Studien zu diesem Thema veröffentlicht. In Europa unterscheiden sich z. B. die Muster zur Antibiotikaresistenz von Enterokokken zwischen den Ländern so stark, dass eine britische Datenbank nicht für Standorte in Frankreich, Schweden und Spanien genutzt werden konnte (Ebdon und Taylor, 2006). Dies lässt darauf schließen, dass Datenbanken für lokale Anwendungen erstellt werden müssen. Auch die zeitliche Stabilität der Datenbank muss berücksichtigt werden. Mehrere Studien zeigten Veränderungen in den *E. coli*-Profilen über die Zeit (z. B. Hansen et al., 2009; Jenkins et al., 2003).

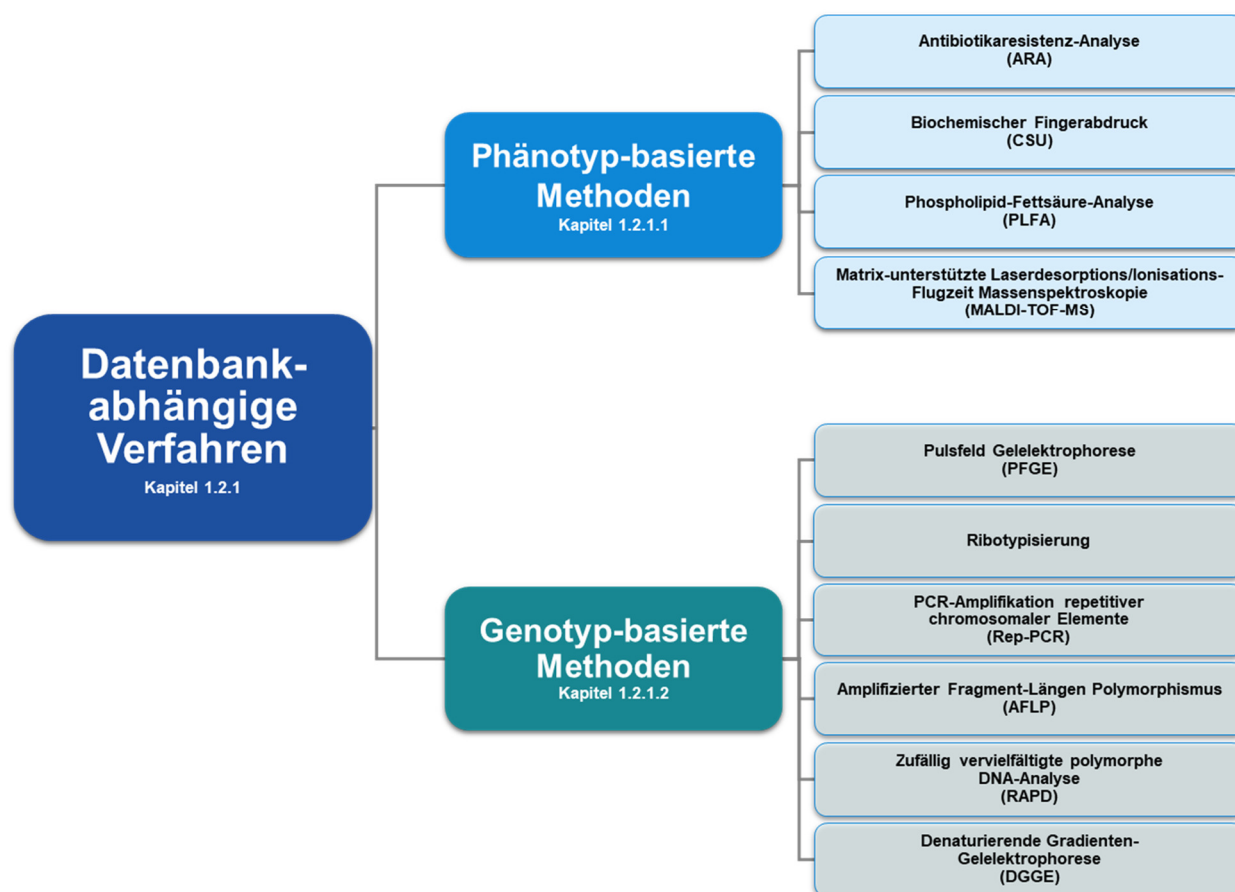


Abbildung 1.4: Überblick der Datenbank-abhängigen Microbial Source Tracking-Methoden.

1.2.1.1 Phänotyp-basierte Methoden

Bei den phänotypischen Methoden werden Eigenschaften wie beispielsweise Antibiotikaresistenzen (Harwood et al., 2000), Profile zur Nutzung verschiedener Kohlenstoffquellen (Carbon-Source Utilization Profiling, CSU) und die Fettsäuren-Zusammensetzung der Bakterien erfasst.

Antibiotikaresistenz-Analyse

Die Antibiotikaresistenz-Analyse (ARA), auch als Antibiotikaresistenz-Profilerstellung (ARP) bekannt, beruht auf der phänotypischen Resistenz von Bakterien gegenüber antimikrobiellen Substanzen. Es liegt die Annahme zugrunde, dass Menschen und Tiere (vor allem Wildtiere und Tiere aus der Landwirtschaft) unterschiedlichen Antibiotikasspektren ausgesetzt sind, und sich deshalb unterschiedliche Resistenzen entwickeln (Scott et al., 2002; Simpson et al., 2002). Aus diesem Grund werden die Antibiotikaresistenzen von Isolaten aus verschiedenen möglichen fäkalen Eintragsquellen erfasst und mit dem Resistenzmuster von Isolaten aus der Umwelt verglichen.

Bei den MST-Studien, die ARA-Untersuchungen nutzten, konnten die Isolate nur bis zu einem gewissen Grad richtig zugeordnet werden. Mit einer von Wiggins (Harwood et al., 2003; Wiggins, 1996) erstellten ARA-Datenbank (n=1435 Isolate) konnten menschliche und nicht-menschliche

Isolate mit einer Quote von 95 % richtig zugeordnet werden. Als im Rahmen einer weiteren Studie von Wiggins et al. (2003) mit Hilfe einer neuen Datenbank für sechs verschiedene Wassereinzugsgebiete (n=6.857 Isolate) die Isolate in die drei Kategorien Mensch, Haus- und Wildtiere zugeordnet werden sollten, sank die durchschnittliche Rate für richtige Zuordnungen auf 57 %. Insgesamt konnte aber gezeigt werden, dass größere Datenbanken die Repräsentativität und damit auch die Wahrscheinlichkeit der richtigen Einordnung der Isolate erhöhen (Harwood et al., 2003; Wiggins et al., 2003). In einer Studie von Hagedorn et al. (1999) konnten aus den Ergebnissen der ARA-Untersuchungen Managementmaßnahmen abgeleitet werden, die zu einer effektiven Reduzierung der fäkalen Belastung im Einzugsgebiet führten. Dieses Beispiel zeigt die erfolgreiche Anwendung dieser Art der Identifizierung fäkaler Eintragsquellen in die aquatische Umwelt. ARA wurde in zahlreichen Untersuchungen zur Herkunftsbestimmung fäkaler Kontaminationen im Einzugsgebietsmaßstab (z. B. Graves et al., 2007; Olivas und Faulkner, 2008), aber auch in Studien zum Vergleich verschiedener MST-Methoden (z. B. Price et al., 2007; Samadpour et al., 2005) eingesetzt.

Eine Einschränkung der ARA als MST-Werkzeug ist die fragliche Stabilität der Antibiotikaresistenzen von Bakterien, sowohl im Labor als auch in der natürlichen Umgebung. Die genetischen Elemente, die multiple Antibiotikaresistenzgene tragen, sind mobil, so dass sich das Resistenzprofil ständig ändern kann (Simpson et al., 2002).

Biochemischer Fingerabdruck

Die Methode des biochemischen Fingerabdrucks basiert auf der Fähigkeit von Bakterien unterschiedliche Kohlenstoffe (Carbon source utilization, CSU) zu metabolisieren. Sogar innerhalb einer Spezies, wie z. B. *E. coli*, ist ein hoher Grad an phänotypischer Diversität hinsichtlich der Metabolisierung verschiedener Substrate zu finden. Für die Durchführung der Messungen stehen kommerzielle Testsysteme im Mikrotiterplatten-Format zur Verfügung.

Die erste veröffentlichte Studie, die CSU-Untersuchungen zur Identifizierung fäkaler Eintragsquellen durchführte, nutzte das MicroPlate™ System von Biolog Inc. zur Charakterisierung von Enterokokken. Mit diesem Ansatz konnten durchschnittlich 92,7 % der Isolate richtig in die Gruppen human und nicht-human eingeordnet werden (Hagedorn et al., 2003). Wallis und Taylor (2003) verwendeten das PhenePlate-System (Bio Sys Inova) für MST-Untersuchungen. Seit den ersten Studien wurden weitere Studien zu den beiden kommerziellen Systemen veröffentlicht (z. B. Ahmed et al., 2005; Ahmed et al., 2006; Moussa und Massengale, 2008).

Zu den Vorteilen dieses Ansatzes zählen die Verfügbarkeit von Platten und Reagenzien, die kommerziell hergestellt werden, und die damit einhergehende gute Standardisierung des Verfahrens.

Phospholipid-Fettsäure-Analyse

Phospholipide und die daran gebundenen Fettsäuren sind essentielle Komponenten von bakteriellen Zellwänden. Die Zellwände weisen je nach Spezies Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung der Fettsäuren auf (Haznedaroğlu et al., 2005). Die Phospholipid-Fettsäure-Analyse (Phospholipid Fatty Acid Analysis, PFLA) wird in der klinischen Mikrobiologie zur Identifizierung von Organismen in epidemiologischen Studien (z. B. Birnbaum

et al., 1994; Kühn et al., 1997) sowie in der Umweltmikrobiologie für Gemeinschaftsanalysen (z. B. Dunfield und Germida, 2003; Schutter und Dick, 2000) eingesetzt.

Bei der Durchführung der PLFA-Analyse werden zuerst die PLFAs durch organische Lösungsmittel- oder Festphasenextraktion aus einer Probe gewonnen (Zelles, 1999). Die extrahierten Fettsäuren und ihre Derivate werden mittels Gaschromatographie analysiert, um ein PLFA-Profil zu erzeugen, das eine Liste von Fettsäuren und deren molaren Häufigkeiten enthält (Zelles, 1999).

PFLA-Analysen können auch für MST-Studien genutzt werden. Bislang ist die Zahl solcher MST-Studien begrenzt (Genthner et al., 2005; Parveen et al., 2001; Seurinck et al., 2006). Einige dieser Studien zeigten keine ausreichende Differenzierung der Bakterien anhand der PFLA-Profile. Im Gegensatz dazu konnte in einer Studie von Seurinck et al. (2006) eindeutig zwischen humanen und nicht-humanen *E. coli*-Bakterien unterschieden werden. Eine weitere Differenzierung der tierischen Quellen war nicht möglich.

Die Unterscheidung von fäkalen Eintragsquellen anhand der PFLA-Muster ist von der untersuchten Bakterienart abhängig (Parveen et al., 2001). Untersuchungen zu den PFLA-Profilen von Enterokokken, *E. coli*, fäkalen Coliformen und Gesamtciformen zeigt, dass Gruppen, die aus mehreren Arten oder Gattungen bestehen, besser für solche Untersuchungen geeignet sind (Yurtsever et al., 2007). Mit der Gruppe der *E. coli*-Bakterien konnte nur eine sehr ungenaue Differenzierung erreicht werden (Yurtsever et al., 2007).

Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektroskopie

Die Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektroskopie (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF-MS) ist eine sehr neue Methode für MST-Anwendungen. Für die Identifizierung von Bakterien mittels MALDI-TOF-MS wird eine kleine Menge einer Bakterienkolonie, eingebettet in Matrix, in einen MALDI Biotyper eingeführt, und dort im Vakuum durch einen fokussierten Laserstrahl explosionsartig verdampft. Dabei werden die Proteine der Bakterien ionisiert. Über die Flugzeit der Proteine lassen sich ihre Massen bestimmen, die dann als Gesamtspektrum dargestellt werden. Die ribosomalen Proteine bilden dabei den größten Anteil im Messspektrum. Da ihre Spektren charakteristisch für einzelne Bakterienarten sind, entsteht somit ein molekularer Fingerabdruck, auf dessen Grundlage die einzelnen Spezies differenziert werden können.

Ein großer Vorteil der Identifizierung mittels MALDI-TOF-MS ist die Schnelligkeit der Messung. Liegen Bakterienisolate vor, so erhält man innerhalb weniger Minuten einen molekularen Fingerabdruck. Weitere Vorteile sind eine hohe Präzision und Empfindlichkeit der Messung (Schubert und Wieser, 2010). Aufgrund der genannten Vorteile hat sich die Identifizierung von Bakterien mittels MALDI-TOF-MS in den letzten Jahren im medizinisch-diagnostischen Bereich etabliert. Auch für MST-Anwendungen erscheint diese Technik zukunftssträftig (Christ et al., 2017). Allerdings ist – wie bei allen Datenbank-abhängigen Methoden – die Qualität der Identifizierung stark von der zugrundeliegenden Datenbank abhängig.

1.2.1.2 Genotyp-basierte Methoden

Unter den Datenbank-abhängigen Methoden gibt es auch genotypische Verfahren, die als DNA-*Fingerprint*-Methoden bezeichnet werden. Dabei werden verschiedenste Gene oder DNA-Abschnitte mit Hilfe der PCR amplifiziert, mit Restriktionsenzymen geschnitten und über eine Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennt. Die entstandenen Bandenmuster werden digital mit Datenbanken abgeglichen (Field und Samadpour, 2007).

Pulsfeld-Gelelektrophorese

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*, PFGE) wurde von Schwartz und Cantor (1984) entwickelt und basiert auf einer Agarosegelelektrophorese mit elektrischen Wechselempulsen. Vor der Elektrophorese wird die genomische DNA der Bakterienisolate mit einem Restriktionsenzym, welches nur an wenigen Positionen schneidet, behandelt. Auf diese Weise wird eine begrenzte Anzahl an Fragmenten erzeugt.

Diese Methode wird häufig verwendet, um Bakterien zu identifizieren, die bei Krankheitsausbrüchen auftreten (Swaminathan et al., 2001). Es gibt einige Studien, bei denen die PFGE-Methode zur Identifizierung fäkaler Einträge eingesetzt wurde. Diese ergaben keine eindeutigen Ergebnisse, wobei die genutzten Datenbanken klein waren (z. B. Johnson et al., 2017; Parveen et al., 2001).

Die PFGE ist sehr empfindlich gegenüber kleinen genetischen Unterschieden (Scott et al., 2002). Sie zeichnet sich durch eine sehr gute Reproduzierbarkeit aus (Farber, 1996). In Situationen, in denen die Anzahl von möglichen fäkalen Eintragsquellen sehr begrenzt ist, kann der Einsatz dieser MST-Methode zielführend sein (Myoda et al., 2003). Insgesamt ist diese Methode allerdings nicht unumstritten. McLellan et al. (2003) stellten fest, dass PFGE-Profile sehr vielfältig und komplex sind, so dass ein Vergleich und die damit verbundene Zuordnung schwierig ist. Aus diesem Grund wird für komplexe Wassereinzugsgebiete die Erstellung einer sehr großen PFGE-Profil-Datenbank empfohlen (Lu et al., 2004).

Ribotypisierung

Bei der Ribotypisierung wird die DNA eines Organismus mit einem Restriktionsenzym geschnitten, die Fragmente anschließend elektrophoretisch getrennt und mit einer ribosomalen RNA-Sonde hybridisiert (Farber, 1996). Da Unterschiede in den ribosomalen RNA-Sequenzen zum Verlust oder zur Entstehung von Bindestellen für Restriktionsendonukleasen führen können, sind die resultierenden Fragment-Muster spezifisch.

Die erste veröffentlichte MST-Studie, die Ribotypisierung zur Analyse von *E. coli*-Isolaten einsetzte, konnte mit einer 82 %-igen Wahrscheinlichkeit zwischen humanen und nicht-humanen Quellen unterscheiden (Parveen et al., 1999). Carson et al. (2001) konnten mit einer Datenbank von 287 *E. coli*-Isolaten durchschnittlich 97,1 % der Isolate richtig einordnen (human/nicht-human). Zusätzlich zu diesen Pilotstudien wurde die Ribotypisierung auch in neueren MST-Studien erfolgreich angewendet (Carson et al., 2003; Meays et al., 2004; Moore et al., 2005).

Der Abschnitt der DNA, der für rRNA kodiert, ist hochkonserviert. Konserviert bedeutet, dass diese Sequenzen bei nahezu allen Organismen oder zumindest innerhalb einer Organismengruppe gleich sind. Daher wird die Ribotypisierung als das molekulare Verfahren mit der höchsten Reproduzierbarkeit angesehen (Farber, 1996; Hartel et al., 2003; van Belkum et al., 2001).

PCR basierend auf repetitiven chromosomalen Elementen (Rep-PCR)

Eine weitere DNA-Fingerprinting-Technik ist die PCR, basierend auf repetitiven chromosomalen Elementen (Rep-PCR). Repetitive chromosomale Elemente, die zufällig verteilt im Bakterienchromosom vorliegen, sind die Zielstruktur dieser PCR-basierten Methode. Diese Sequenzen sind in bakteriellen Genomen weit verbreitet (Versalovic et al., 1991). Da die Anzahl und Lokalisation der repetitiven Elemente von Stamm zu Stamm variabel sind, können die mit der Rep-PCR ermittelten Bandenmuster zur Differenzierung herangezogen werden. Die drei am häufigsten untersuchten prokaryotischen repetitiven Sequenzen sind das BOX-Element (Martin et al., 1992), enterobakterielle repetitive intergenische Konsensus (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus, ERIC)-Sequenzen (Hulton et al., 1991) und repetitive extragene Palindrome (REP) (Stern et al., 1984).

Für MST-Anwendungen wurden am häufigsten Primer verwendet, die an das BOX-Element binden. Die BOX-PCR-Analysen wurden bereits für MST-Studien in Nordamerika genutzt (Carson et al., 2003; Chandran und Mazumder, 2015; Kon et al., 2009; Seurinck et al., 2003; Somarelli et al., 2007).

Im Vergleich zu PFGE und Ribotypisierung ist die Durchführung von Rep-PCR-Analysen technisch weniger anspruchsvoll (United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2005). Allerdings wird die Reproduzierbarkeit dieser Methode nur als moderat bewertet (Johnson et al., 2004; Scott et al., 2002; Seurinck et al., 2005).

Amplifizierter Fragment-Längen-Polymorphismus

Amplifizierter Fragment-Längen-Polymorphismus (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) ist ein weiteres Datenbank-abhängiges Verfahren, das auf dem PCR-Nachweis von DNA-Fragmenten beruht, die aus dem vollständigen Verdau genomischer DNA mit Restriktionsenzymen resultieren (Vos et al., 1995). Das gebräuchlichste AFLP-Protokoll für MST-Zwecke sieht einen Verdau der genomischen DNA mit zwei Restriktionsenzymen, einer anschließenden Ligation von Adaptoren, die als Bindungsstellen für PCR-Primer fungieren, und eine PCR-Amplifikation vor. Auf diese Weise kann eine Teilmenge der genomischen Restriktionsfragmente selektiv vervielfältigt werden (Bleas et al., 1998; Olive und Bean, 1999). Es sind mehrere kommerzielle Kits für AFLP-Analysen verfügbar.

Insgesamt sind nur wenige MST-Studien, die AFLP nutzen, veröffentlicht. In einer AFLP-Untersuchung, die sich nur auf eine kleine Datenbank von 105 *E. coli*-Isolaten stützt, konnten die meisten Isolate (über 94 %) korrekt in die Kategorien Nutztiere, Wildtiere und Mensch klassifiziert werden (Guan et al., 2002). In einer weiteren Studie wurden 110 pathogene *E. coli*-Stämme erfolgreich in die Ursprungsgruppen Rind, Mensch und Schwein eingeordnet, obwohl die Isolate aus unterschiedlichen geografischen Regionen stammten (Leung et al., 2004). Dies deutet darauf

hin, dass AFLP-Profile geografisch stabil sind. Auch die AFLP-Analyse von Enterokokken wurde bereits zur Identifizierung fäkaler Eintragsquellen genutzt (Burtscher et al., 2006).

Positive Aspekte der AFLP-Analytik sind ihre Reproduzierbarkeit und Robustheit (Bleas et al., 1998; Vos et al., 1995). Die Methode ist in der Lage Polymorphismen im gesamten Genom zu erfassen. Dies ist ein großer Vorteil gegenüber anderen Fingerprint-Methoden (Simpson et al., 2002). Allerdings gibt es noch Wissenslücken hinsichtlich geeigneter Primersysteme für den Einsatz dieser Methode für MST-Zwecke.

Zufällig vervielfältigte polymorphe DNA-Analyse

Die zufällig vervielfältigte polymorphe DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)-Analyse und die arbiträr geprimte PCR (Arbitrarily Primed PCR, AP-PCR) zählen ebenfalls zu den PCR-basierten Datenbank-abhängigen Verfahren (Welsh und McClelland, 1990; Williams et al., 1990). Ein kurzer Oligonukleotid-Primer (8-12 Nukleotide) mit zufälliger DNA-Sequenz wird zur Amplifikation von Fragmenten aus der genomischen DNA eines Organismus genutzt (Welsh und McClelland, 1990). Dabei vervielfältigen sich DNA-Bereiche, die von der Primer-Sequenz eingeschlossen werden. Es entstehen je nach Organismus mehrere Sätze von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe, die in der Elektrophorese individuelle Muster erzeugen.

RAPD-Analyse und AP-PCR liefern ähnliche Ergebnisse, zeichnen sich aber durch unterschiedliche Reaktionsbedingungen aus. Für die AP-PCR werden zufällige Primer mit niedriger Stringenz verwendet, wohingegen bei der RAPD nicht-selektive Primer mit einer hohen Stringenz eingesetzt werden (United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2005). Es ist eine begrenzte Anzahl an veröffentlichten MST-Studien, die den Einsatz von RAPD zur Identifizierung fäkaler Eintragsquellen geprüft haben, verfügbar. In einer dieser Studien wurden verschiedene Primersysteme vergleichend betrachtet (Venieri et al., 2004). Die Ergebnisse zeigen, dass die RAPD-Analyse mit ausgewählten Primersystemen eine erfolgreiche Unterscheidung von *E. coli*-Isolaten menschlichen und tierischen Ursprungs ermöglicht. Auch Feldstudien mit RAPD wurden bereits durchgeführt (Ting et al., 2003).

Denaturierende-Gradienten-Gelelektrophorese

Die Denaturierende-Gradienten-Gelelektrophorese (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) ist eine typische Fingerprinting-Technik. Sie basiert darauf, dass PCR-Produkte gleicher Länge in einem Polyacrylamidgel mit einem denaturierenden Harnstoff-Formamid-Gradienten entsprechend ihres Schmelzverhaltens aufgetrennt werden (Muyzer et al., 1993). Ebenso wie bei den vorher beschriebenen Analysen diente das DNA-Extrakt von Bakterienisolaten als Ausgangsmaterial für die Amplifikation bestimmter DNA-Sequenzen mittels PCR. Für die PCR-DGGE-Analytik werden Primer verwendet, die an phylogenetisch konservierte Regionen der DNA binden. Hierzu können vor allem Struktur-Marker, wie die ribosomalen RNA Gene genutzt werden. Es entstehen PCR-Produkte gleicher oder ähnlicher Größe, die für weitere Analysen differenziert werden müssen. Die anschließende DGGE erlaubt die Auftrennung von DNA-Molekülen, die sich in nur einer Base unterscheiden. Die Separation der DNA-Fragmente basiert auf dem unterschiedlichen Schmelzverhalten der Basenpaare der DNA-Doppelhelix in Lösung (Sheffield et al., 1989). In Anwesenheit eines denaturierenden Agens schmelzen DNA-Moleküle in verschiedene Segmente – melting domains genannt – auf. In einem DGGE-System werden

DNA-Fragmente in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Das Gel beinhaltet einen linearen Gradienten mit ansteigender Konzentration an denaturierendem Agens (Harnstoff/ Formamid) von Kathode zu Anode. Eine zunehmende Konzentration eines denaturierenden Agens (z. B. Formamid) führt zur Dissoziierung und Retardierung der DNA an einer bestimmten Stelle im Gel. Damit sich die DNA-Stränge nicht vollständig voneinander trennen und damit schnell aus dem Gel herauslaufen, wird eine schmelzstabile GC-reiche Region während der PCR an die DNA-Fragmente angehängt (GC-Klammer).

Nach Auftrennung der PCR-Produkte entsprechend ihrer Basenfolge in einem Gradientengel ergeben sich je nach eingesetzter Probe individuelle Bandenmuster, sozusagen ein Fingerabdruck der mikrobiellen Gemeinschaft zum Zeitpunkt der Probennahme. Aufgrund ihres Erscheinungsbildes in Gelen lassen sich bei den erhaltenen genetischen Profilen schnell und direkt gemeinsame und unterschiedliche Banden identifizieren.

MST ist ein relativ neues Anwendungsgebiet für die DGGE. Die meisten Untersuchungen konzentrieren sich auf die Ermittlung von Zielsequenzen für die PCR-Amplifikation, die für solche Untersuchungen geeignet sind. Als mögliche Zielsequenzen wurden die Intergenische Spacer-Region (ISR) zwischen 16S und 23S rDNA bei *E. coli*-Isolaten (Buchan et al., 2001), das β -Glucuronidase Gen *uidA* von *E. coli* (Farnleitner et al., 2000; Neave et al., 2014), sowie die Gene *mdh* und *phoE* (Esseili et al., 2008; Neave et al., 2014) diskutiert.

1.2.2 Datenbank-unabhängige Methoden

In diesem Kapitel werden Datenbank-unabhängige MST-Methoden beschrieben, die meist auf dem selektiven Nachweis von Verursacher-spezifischen Markern basieren. Um diese Methoden zu verstehen, muss die Zusammensetzung von Fäkalien näher betrachtet werden. Insbesondere die Zusammensetzung und Struktur intestinaler bakterieller Gemeinschaften bildet die wissenschaftliche Grundlage für viele Datenbank-unabhängige MST-Verfahren. Die prokaryotische Abundanz kann im Darm von Tier und Mensch Zellzahlen von mehr als 10^{11} Zellen pro g erreichen (Whitman et al., 1998). Im Gegensatz dazu zeigen nicht-intestinale Systeme, wie z. B. die aquatische Umwelt, Bakterienzahlen zwischen 10^4 und 10^8 Zellen pro mL (Kirschner et al., 2002; Whitman et al., 1998; Wilhartitz et al., 2007).

Trotz dieser hohen Konzentrationen zeigen Darmbakterien im Vergleich zu anderen Ökosystemen eine überraschend geringe Diversität auf der höheren taxonomischen Ebene. Die intestinale Mikrobiota des Menschen umfasst nur neun Phyla, wobei *Firmicutes* und *Bacteroidetes* die dominierenden Phyla sind (98 % der bakteriellen Abundanz) (Bäckhed et al., 2005; Eckburg et al., 2005; Ley et al., 2008a). Bakterien des Phylums *Proteobacteria*, das auch die coliformen Bakterien und *E. coli* umfasst, spielen also nur eine untergeordnete Rolle. Im Gegensatz dazu ist die Diversität auf dem niedrigen taxonomischen Niveau der dominierenden Phyla (z. B. Spezies- und Subspezies-Bereich) sehr groß (Eckburg et al., 2005). Die große phylogenetische Vielfalt geht mit einer ausgeprägten metabolischen Diversität einher (Turnbaugh et al., 2006).

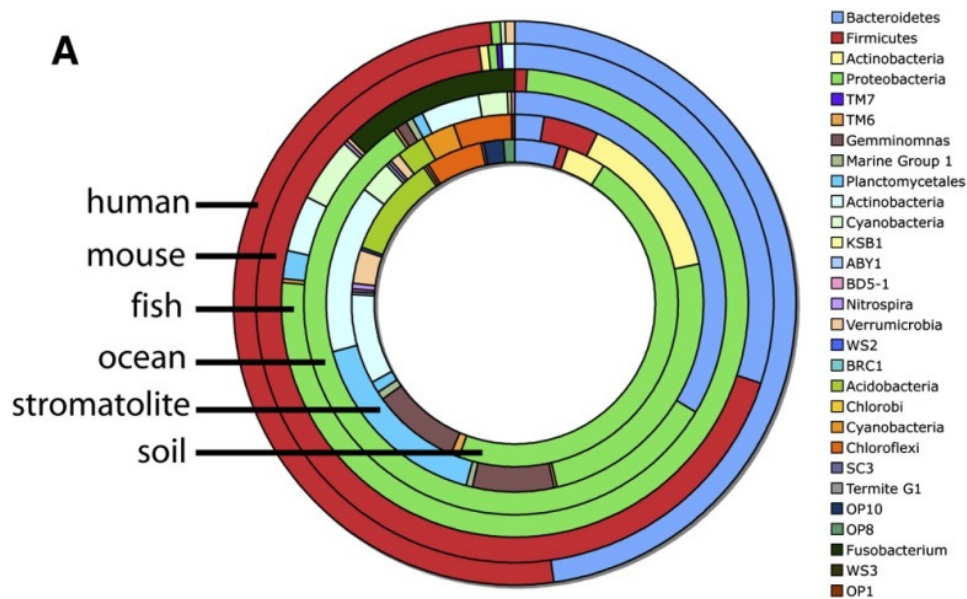


Abbildung 1.5: Vergleich der mikrobiellen Diversität z. B. im menschlichem Kolon, Maus-Zökum, Ozean und Boden (Quelle: Ley et al., 2006). Darstellung der prozentualen Zusammensetzung in verschiedenen Habitaten.

Die mikrobiologische Analyse der Wasserqualität beruht hauptsächlich auf dem Nachweis von fakultativ aeroben oder Sauerstoff-toleranten intestinalen Keimen. Bakterien wie *E. coli* und Enterokokken werden durch die Anwesenheit von Sauerstoff nicht geschädigt. Für obligate anaerobe Bakterien ist die Anwesenheit von Sauerstoff schädlich. Abhängig von der Sauerstoffempfindlichkeit der jeweiligen Bakteriengruppe und der vorherrschenden Sauerstoffkonzentration im untersuchten Gewässer können intestinale Anaerobier nur eine kurze Zeitspanne (diagnostischer Zeitrahmen: Stunden bis Tage) nach ihrem Eintrag mittels Kulturverfahren nachgewiesen werden (Bonjoch et al., 2009). Für ihre Kultivierung müssen anoxische Inkubationsbedingungen eingestellt werden. Im Gegensatz zur Kultivierung ist der Nachweis intestinaler Anaerobier mittels DNA-basierter molekularer Methoden über längere Zeiträume (Tagen bis Monaten) möglich (Bae und Wuertz, 2009; Bonjoch et al., 2009; Okabe und Shimazu, 2007), da hier auch inaktive Zellen erfasst werden.

Die Aufrechterhaltung der Zellintegrität ist das Hauptkriterium für eine erfolgreiche Anreicherung mittels Membranfiltration (Okabe und Shimazu, 2007).

Eine Ausnahme stellen Sporen-bildende intestinale Bakterien dar. Diese Sporen können extrem lange Zeiträume in der Umwelt persistieren, und noch nach Jahren bis Jahrzehnten mittels Kulturverfahren nachgewiesen werden (Skanavis und Yanko, 2001). Intestinale Sporen können daher als konservative Marker für eine fäkale Verschmutzung in der aquatischen Umwelt nützlich sein.

In Hinblick auf die Identifizierung von fäkalen Eintragsquellen sollten entsprechende Methoden und Zielparameter (Target) idealerweise folgende grundlegende Anforderungen erfüllen:

- Das MST-Target sollte nur im Fäkalmaterial der jeweiligen betrachteten Eintragsquelle auftreten. Folglich sollte das Target nicht im Kot anderer Eintragsquellen vorkommen, auch wenn es sich um sehr nahverwandte Wirte handelt.
- MST-Targets sollten in vergleichbarer Anzahl in Kot aller Untergruppen vorhanden sein. Außerdem sollte der Marker in hohen Konzentrationen mit dem Kot ausgeschieden werden. Diese Konzentrationen sollten auf einem vergleichbaren oder höheren Niveau liegen wie die klassischen Indikatorbakterien.
- Wenn die Bedeutung der fäkalen Belastung aus unterschiedlichen Eintragsquellen bewertet werden soll, ist eine Quantifizierung des Markers unabdingbar. Darüber hinaus sind Informationen über die Persistenz der Zielparameter in der Umwelt für die Interpretation der Ergebnisse wichtig.

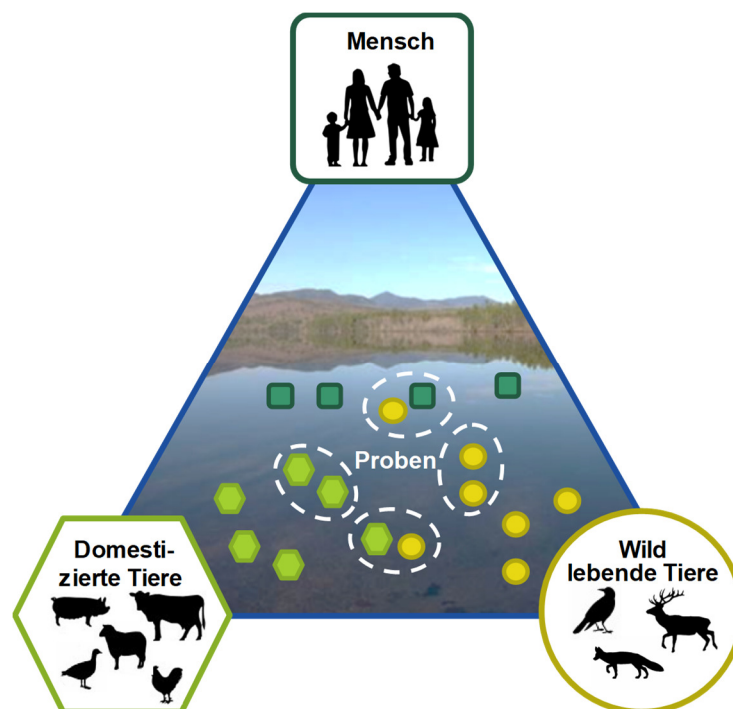


Abbildung 1.6: Multiple Eintragsquellen fäkaler Kontaminationen im Wasserkörper (nach Roslev und Bukh, 2011).

In den letzten Jahren haben sich immer mehr wissenschaftliche Beweise dafür ergeben, dass Zielparameter existieren, die die gestellten Anforderungen erfüllen. Dies gilt u. a. für die Gruppe der intestinalen Bakterien. Studien zeigen, dass die Phylogenie des Wirtes sich in der Zusammensetzung der Darmmikrobiota widerspiegelt. Dieser evolutionäre Zusammenhang zwischen Wirt und intestinaler Bakteriengemeinschaft stützt die Hypothese der Existenz von wirtsspezifischen Bakteriengruppen (Ley et al., 2006). Die Ergebnisse geben aber auch Hinweise auf zusätzliche Einflussfaktoren wie Ernährung, Morphologie des Wirtes und geografische Herkunft (Ley et al., 2008a; Ley et al., 2008b). Neben den Darmbakterien werden aber auch andere Parameter zur Identifizierung fäkaler Eintragsquellen diskutiert. Hierzu zählen u. a. verschiedene Toxingene, mitochondriale DNA-Sequenzen und Viren.

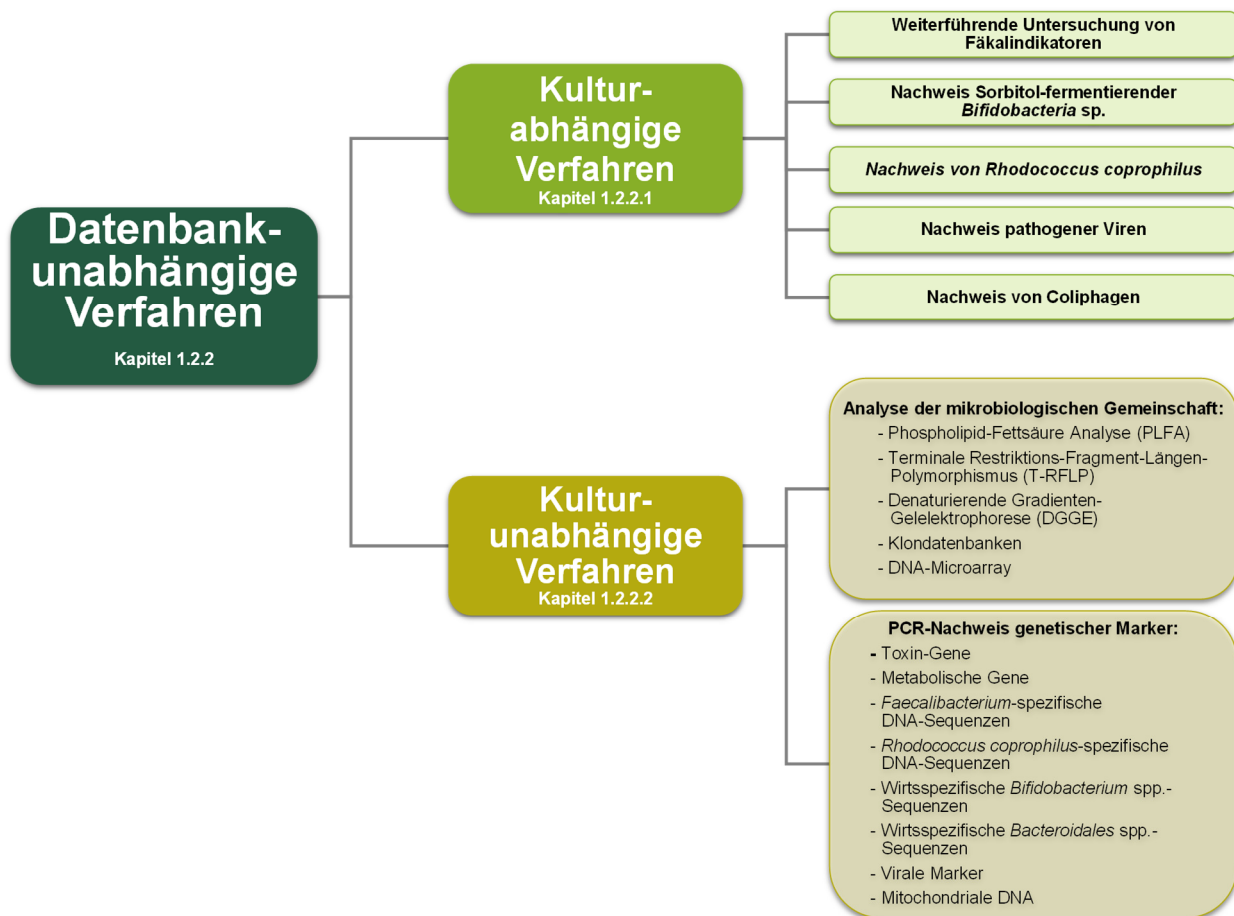


Abbildung 1.7: Überblick der Datenbank-unabhängigen Microbial Source Tracking-Methoden.

1.2.2.1 Kultur-abhängige Verfahren

Wie bei allen methodischen Ansätzen gibt es einige grundlegende Eigenschaften, die bei der Anwendung dieser Methoden beachtet werden müssen. Bei den Kultur-basierten Methoden werden die Ergebnisse entscheidend durch die Formulierung der Medien und die angewendeten Kultivierungsbedingungen beeinflusst. Die Standardisierung der verwendeten Medien und Techniken sind grundlegende Voraussetzung für reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse.

Weiterführende Untersuchung von fäkalen Indikatorbakterien

Wie bereits erläutert, basierten erste Versuche zur Unterscheidung von humanen und nicht-humanen fäkalen Einträgen auf dem Verhältnis von fäkalen Coliformen zu fäkalen Streptokokken. Ein weiterer Ansatz, der auf Routineparametern der mikrobiologischen Wasserqualitätsüberwachung basiert, ist das Verhältnis von atypischen zu typischen Kolonien von coliformen Bakterien (Nieman und Brion, 2003). Diese Methode wurde ursprünglich als Verfahren zur Bestimmung des Alters einer Kontamination eingesetzt, fand aber auch Anwendung bei der Quellenidentifizierung (z. B. Coakley et al., 2009; Ward et al., 2009). Allerdings kann dieser

Ansatz die Charakterisierung fäkaler Verschmutzungen zwar unterstützen, ist aber nicht als alleinstehendes Verfahren geeignet (Coakley et al., 2009).

Andere Studien stellten die Hypothese auf, dass einige Enterokokken-Spezies ein begrenztes Wirtsspektrum haben könnten (Geldreich und Kenner, 1969; Leclerc et al., 1996). Es wurde z. B. festgestellt, dass das Vorkommen von *Enterococcus faecalis* in einigen Untersuchungen auf Fäkaleinträge durch Mensch und Geflügel beschränkt ist (Kuntz et al., 2004; Pourcher et al., 1991; Wheeler et al., 2002). Diese Studien basieren hauptsächlich auf der selektiven Kultivierung von Enterokokken und deren Charakterisierung mit Hilfe biochemischer und molekularer Verfahren, und werden daher als Datenbank-basierte Ansätze angesehen. Es wurden jedoch mehrere Versuche unternommen, die Kultur-basierte Spezies-Identifizierung durch Spezies-spezifische PCR-Assays zu ersetzen (Harwood et al., 2004; Layton et al., 2010). Allerdings konnte keine Enterokokken-Spezies identifiziert werden, die spezifisch für eine bestimmte Eintragsquelle ist (Layton et al., 2010).

Untersuchungen von Farnleitner et al. (2010) legen nahe, dass Sporen des anaeroben Bakteriums *Clostridium perfringens* ein guter konservativer Indikator für einen anthropogenen Einfluss (Mensch und Tier) sein könnten. *C. perfringens* wurde im Kot von Menschen, Nutztieren und Fleischfressern in hohen Konzentrationen nachgewiesen, wohingegen im Kot von pflanzenfressenden Wildtieren nur sehr geringe Zahlen gefunden wurden (Farnleitner et al., 2010). Diese Befunde stimmen mit Studien überein, die *C. perfringens*-Sporen erfolgreich als konservativen Tracer für Abwasserverunreinigung in marinen Systemen verwendeten (Hill et al., 1996; Skanavis und Yanko, 2001; Sorensen et al., 1989). Ein Nachteil dieses Ansatzes ist, dass *C. perfringens* in vielen anthropogenen Quellen in wesentlich geringeren Konzentrationen auftritt als *E. coli* (ungefähr Faktor 100, (Farnleitner et al., 2010). Dies schränkt den Anwendungsbereich deutlich ein.

Auch Verfahren, die auf dem Nachweis von Toxin- und Virulenzgenen beruhen, können für ein MST eingesetzt werden. Hierzu wird meist eine Kombination aus Kultivierung und molekularem Nachweis der Marker genutzt. In der Literatur wurden bereits mehrere Methoden beschrieben, die auf dem Nachweis von Virulenzgenen in enterotoxischen *E. coli* (ETEC)-Bakterien beruhen. Hierbei wird eine human- bzw. Schweine-spezifische Variante des hitzestabilen STI bzw. STII-Toxins (Khatib et al., 2003) sowie eine Rinder-spezifische Variante des hitzelabilen Proteins LTIIA (Khatib et al., 2002; Tsai et al., 2003) detektiert. Der Hauptnachteil dieses Ansatzes besteht darin, dass diese Toxingene nur von infizierten Wirten abgegeben werden. Wie beim Nachweis anderer Pathogener hängt der Nachweis der Prävalenz von Erkrankung und den Konzentrationen im Kot infizierter Wirte ab. Daher ist die Anwendung dieser Methoden stark limitiert.

Ein weiterer Marker für menschliche Fäkalverunreinigungen ist das Oberflächenprotein esp, das in *Enterococcus faecium* gefunden wurde (Scott et al., 2005). Die Methode basiert auf der Anreicherung von Enterokokken über Membranfiltration, Kultivierung auf selektivem Nähragar und dem anschließenden Nachweis des Markers mittels PCR. Mehrere Studien bescheinigen der Methode eine gute Spezifität und Sensitivität (Ahmed et al., 2008c; Ahmed et al., 2008b; Ahmed et al., 2008d; Ahmed und Katouli, 2008; Scott et al., 2005), während andere Studien den Marker aufgrund unzureichender Prävalenz und Spezifität nicht empfehlen (Byappanahalli et al., 2008;

Layton et al., 2009). Ungeachtet dieser widersprüchlichen Aussagen ist die Anwendung dieses Ansatzes durch einen großen Nachteil eingeschränkt. Das Markergen kann nur in etwa 1 % der kultivierten Enterokokken nachgewiesen werden (Scott et al., 2009). Deshalb können mit diesem Ansatz keine moderaten bzw. geringen Verschmutzungen erfasst werden.

Nachweis Sorbitol-fermentierender *Bifidobacteria* sp.

Bifidobakterien wurden bereits vor mehr als 50 Jahren als mögliche Indikatoren für fäkale Verunreinigungen in Betracht gezogen (Gyllenberg et al., 1960). Es handelt es sich um Gram-positive Anaerobier, die in hohen Konzentrationen im Fäkalmaterial von Mensch und Tier vorkommen (Bahaka et al., 1993; Suau et al., 1999). Seit den 1980er Jahren sind Untergruppen der Bifidobakterien als spezifische Indikatoren für die Verschmutzung durch humane Fäkalien in der Diskussion. In den ersten Studien wurde ein YN-6-Medium eingesetzt, um *Bifidobacterium* sp. aus Kot- und Abwasserproben zu isolieren (Resnick und Levin, 1981). Bifidobakterien wurden nur im Kot von Menschen und Schweinen gefunden (Resnick und Levin, 1981). Im nächsten Schritt wurde ein Medium für die selektive Kultivierung von Sorbitol-fermentierenden Bifidobakterien (SFB) entwickelt (Mara und Oragui, 1983). Unter Verwendung dieses Mediums wurde eine hohe Anzahl von SFB in menschlichem Kot und Abwasser, aber nicht in Tierfäkalien detektiert (Mara und Oragui, 1983). Diese Untersuchungen zeigten, dass die SFB ein MST-Marker für humane Einträge sind. Diese Ergebnisse wurden durch Studien in den USA (Resnick und Levin, 1981), Spanien (Blanch et al., 2004; Blanch et al., 2006; Bonjoch et al., 2005), Nigeria und Simbabwe (Mara und Oragui, 1985) sowie Tansania (Mushi et al., 2010) bestätigt.

Mehrere Studien untersuchten die Persistenz kultivierbarer SFB in der aquatischen Umwelt (Bonjoch et al., 2009; Cimenti et al., 2005; Mushi et al., 2010; Ottoson, 2009; Resnick und Levin, 1981). Es stellte sich heraus, dass SFB in der Umwelt nur für relativ kurze Zeit kultivierbar bleiben (T_{90} -Werte von 5 h bis zu 25 Tagen) – insbesondere bei höheren Temperaturen und niedrigeren Salzgehalten (Bonjoch et al., 2009). Nichtsdestotrotz zeigen die zahlreichen Veröffentlichungen, dass der kulturbasierte Nachweis von SFB eine relativ kostengünstige Alternative zu molekularen Methoden für die Identifizierung von frischen humanen Verunreinigungen ist (Cimenti et al., 2005; Mara und Oragui, 1985; Mushi et al., 2010). Aufgrund des schnellen Absterbens der SFB ist aber eine Anpassung der Probennahmestrategie (kurze Intervalle, geringere räumliche Abstände) empfehlenswert (Mushi et al., 2010). Mehrere Studien haben auch einen Kultur-unabhängigen molekularen Nachweis von Bifidobakterien vorgeschlagen (siehe Kapitel 1.2.2.2).

Nachweis von *Rhodococcus coprophilus*

Rhodococcus coprophilus ist ein anaerobes Bakterium aus der Familie der *Nocardiaceae* und wird als spezifischer Indikator für fäkale Kontaminationen durch Nutztiere vorgeschlagen. Sein natürlicher Lebensraum ist der Kot von Pflanzenfressern, in dem das Bakterium sich vermehren kann (Rowbotham et al., 1977). Es wird mit dem Fäkalmaterial ins Gewässer gespült und kann in Wasserproben durch Kultivierung auf selektivem Nähragar nachgewiesen werden (Mara und Oragui, 1981). *R. coprophilus* wurde wiederholt als MST-Target genutzt. Insgesamt zeichnet sich der Marker durch eine hohe Spezifität für Tierkot und eine hohe Persistenz in der Umwelt aus (Jagals et al., 1995). Die relativ geringen Konzentrationen in Kotproben (ca. 10^3 - 10^4 pro Fäzes) und die zeitaufwendige Kultivierung mit 18 Tagen (Mara und Oragui, 1981) mindern das Anwendungspotenzial dieser Methode (Jagals et al., 1995).

Nachweis pathogener Viren

Die Verwendung von Bakterien als Indikatoren fäkaler Kontaminationen im Wasser ist seit langer Zeit üblich. Die fehlende Korrelation zwischen den Konzentrationen von Fäkalindikatorbakterien und der Dichte an pathogenen Mikroorganismen oder dem Risiko von Magen-Darm-Erkrankungen haben Forscher dazu veranlasst, alternative Parameter zur Erfassung der Wasserqualität in Betracht zu ziehen (Ahmed et al., 2013; Colford et al., 2007; Jin et al., 2004). Die genaueste Bewertung der Wasserqualität und des Risikopotenzials würde die direkte Erfassung aller pathogenen Organismen erlauben. Allerdings wäre dieses Überwachungsprogramm wegen des großen Spektrums an relevanten Krankheitserregern extrem arbeits- und kostenintensiv und damit nicht praktikabel. Aus diesem Grund haben sich viele Studien auf den Nachweis eines oder einer Auswahl an häufig auftretenden Erregern fokussiert. Zu den ausgewählten Mikroorganismen zählen die pathogenen Viren. Diese Viren sind Verursacher eines großen Anteils an wasserbedingten Krankheitsfällen (Barwick et al., 2000; Kramer et al., 1996; Lee et al., 2002; Levy et al., 1998, 1998; Yoder et al., 2008). Darüber hinaus sind diese Viren widerstandsfähiger gegenüber Umweltbedingungen wie z. B. Temperatur und Salzgehalt (Havelaar et al., 1990; Jiang, 2006) und Wasserbehandlungsverfahren wie UV-Bestrahlung und Chlorung (Hijnen et al., 2006; Thurston-Enriquez et al., 2003a; Thurston-Enriquez et al., 2003b) als Fäkalindikatorbakterien. Bereits das Vorkommen von sehr geringen Viren-Konzentrationen im Wasser kann zu einer signifikanten Gefährdung der menschlichen Gesundheit führen. Dies ist darin begründet, dass viele pathogene Viren sich durch eine relativ niedrige infektiöse Dosis auszeichnen (Bitton, 2005). Die am häufigsten vorkommenden pathogenen Viren im human geprägten Abwasser umfassen Adenoviren und Enteroviren.

Insgesamt weisen humanpathogene Viren eine hohe Spezifität auf, weshalb sie für die Identifizierung der Herkunft von fäkalen Einträgen geeignet sind. Gleichzeitig ist ihr Nachweis der Beleg für eine Gefährdung der menschlichen Gesundheit und damit Anlass zu Besorgnis. In den vergangenen Jahrzehnten basierten die Nachweisverfahren für pathogene Viren auf Zellkulturverfahren. Diese Zellkulturverfahren sind extrem zeitaufwendig (<14 Tage), teuer und im besten Fall semiquantitativ (United States Environmental Protection Agency (USEPA), 1995). Aufgrund dieser methodischen Nachteile findet der Kultur-basierte Nachweis für Viren kaum Anwendung im MST-Bereich.

Nachweis von Coliphagen

Bakteriophagen, die Darmbakterien infizieren, haben Eigenschaften, die für MST-Studien von Interesse sind. Einige dieser Phagen bleiben in der aquatischen Umwelt lebensfähig und sind in hoher Konzentration im Abwasser vertreten. Gegenwärtig scheinen vor allem die F-spezifischen RNA-Coliphagen und *Bacterioides*-Phagen das größte Potenzial zur Identifizierung von fäkalen Einträgen aufzuweisen.

Bakteriophagen, die *E. coli* infizieren, werden oft als Coliphagen bezeichnet, obwohl einige Stämme auch andere Bakterienspezies infizieren können. Die Gruppe der F-spezifischen Coliphagen umfasst sowohl Phagen, die Einzelstrang-DNA-Genome besitzen als auch Phagen mit RNA-Genomen. Sie infizieren Bakterien über die F-spezifischen Pili. F-RNA-Coliphagen sind gut charakterisiert und lassen eine Unterscheidung von humanen und tierischen Kontaminationen zu. Im Gegensatz dazu finden F-DNA-Phagen nur wenig Beachtung, da sie

nicht so häufig vorkommen wie F-RNA-Phagen und den enterischen Viren morphologisch weniger ähneln (McMinn et al., 2017).

F-spezifische Coliphagen werden regelmäßig in behandelten und unbehandelten Abwässern (häusliches Abwasser sowie das Abwasser aus Kranken- und Schlachthäusern, z. B. Harwood et al., 2005; Hill und Sobsey, 1998) sowie in Abwasser-beeinflussten Oberflächenwässern detektiert (z. B. Contreras-Coll et al., 2002; Lodder und Roda Husman, 2005; Lucena et al., 2003). Der kulturelle Nachweis von lebensfähigen F-spezifischen Coliphagen ist relativ kostengünstig und schnell. Das Verfahren umfasst die Inkubation von Coliphagen in einem Nährmedium mit Wirtsbakterien und die Auswertung anhand der Bildung von Plaques (Zonen ohne Bakterienwachstum).

F-RNA-Coliphagen können in vier serologisch und phylogenetisch getrennte Genogruppen unterschieden werden (Bollback und Huelsenbeck, 2001; Furuse, 1987). Die Genogruppen I und IV sind im Allgemeinen mit Tieren assoziiert, während die Genogruppen II und III mit menschlichen Kontaminationen einhergehen (Love und Sobsey, 2007; Ogorzaly et al., 2010). Auf Grundlage einer hohen Anzahl von Phagen des Genotyps II wurde für verschiedene Fluss- und Grundwässer eine hohe humane Fäkalbelastung postuliert (Haramoto et al., 2011; Ogorzaly et al., 2009). Ebenso wurde die Kontamination eines Oberflächengewässers durch das verstärkte Vorkommen von F-RNA-Coliphagen der Genogruppen I und IV mit landwirtschaftlicher Viehhaltung in Verbindung gebracht (Lee et al., 2011).

Untersuchungen zeigten, dass die Genogruppen der F-RNA-Coliphagen unterschiedliche geografische Verteilung aufweisen. Die Genogruppe II war auf der Hauptinsel Japans weit verbreitet, während Phagen der Genogruppe III im südlichen Teil Japans und Südostasien (Taiwan, Philippinen, Singapur und Indonesien) gefunden wurden (Furuse et al., 1978; Furuse et al., 1979). Außerdem weisen die Untergruppen der F-spezifischen Coliphagen unterschiedliche Überlebensraten im Oberflächenwasser bei verschiedenen Temperaturen auf (Brion et al., 2002; Schaper et al., 2002; Yang und Griffiths, 2013). Des Weiteren können Anzahl und Häufigkeit der vom Wirt ausgeschiedenen F-spezifischen Coliphagen sehr variabel sein (Brion et al., 2002; Yang und Griffiths, 2013). Diese Erkenntnisse erschweren die Detektion der Phagen und Interpretation der Ergebnisse.

Eine weitere Bakteriophagen-Gruppe, die für MST-Untersuchungen genutzt werden kann, sind die *Bacteroides* spp.-infizierenden Bakteriophagen. Diese Bakteriophagen zeichnen sich dadurch aus, dass sie mit einem einfachen, standardisierten Verfahren (DIN EN ISO 14189:2016-11) erfasst werden können; ihre Replikation im natürlichen Gewässer unwahrscheinlich ist (Jofre et al., 1986) und die Untersuchungen keine Referenzdatenbanken oder eine umfangreiche Probenvorbereitung erfordern. In der Literatur werden verschiedene *Bacteroides*-Wirtsstämme für die Erfassung von humanen Fäkalbelastungen genannt. Dazu zählen u. a. die *Bacteroides*-Stämme GB-124 (Payan et al., 2005) und ARABA 84 (Wicki et al., 2011). Der *B. thetaiotaomicron*-Stamm ARABA 84 konnte Phagen in kommunalen Abwässern nachweisen, während der Befund in tierischen Abwässern (Gülleproben und Schlachtabwasser) negativ ausfiel (Wicki et al., 2011).

In Bezug auf Phagen, die den *B. fragilis*-Stamm GB-124 infizieren, wurden widersprüchliche Ergebnisse publiziert. Ebdon et al. (2007) zeigten das völlige Fehlen dieser Phagen in tierischen

Kotproben, wohingegen 100 % der untersuchten kommunalen Abwässer und entsprechend belasteten Oberflächengewässer positiv getestet wurden. Auch in einer Studie von McMin et al. (2014) scheint das Vorkommen von *B. fragilis* GB-124 infizierenden Phagen auf menschliches Abwasser beschränkt zu sein. In 264 Fäkalproben von unterschiedlichen Tieren wurden die Phagen nicht detektiert (McMin et al., 2014). Im Gegensatz dazu zeigt eine andere Studie, dass GB-124 zwar eine gute Sensitivität (60,5 %), jedoch nur eine geringe Spezifität (57,7 %) aufweist (Harwood et al., 2013). Außerdem wurde eine Kreuzreaktion mit zahlreichen tierischen Proben aus den USA beobachtet (Harwood et al., 2013).

1.2.2.2 Kultur-unabhängige Verfahren

In den letzten Jahren wurden MST-Verfahren entwickelt, die nicht auf der Kultivierung von Bakterien und Viren beruhen. Sie umfassen üblicherweise eine Anreicherung der Wasserproben mittels Filtration, gefolgt von der Extraktion der Nukleinsäuren und PCR-Analysen. Bislang wurden Methoden etabliert, die auf dem molekularen Nachweis von Bakterien der Ordnung *Bacteroidales*, Bakterien der Gattungen *Methanobrevibacter*, *Rhodococcus*, *Faecalibacterium*, *Catellibacterium* und *Bifidobacterium* sowie Pathotypen von *Enterococcus* und *E. coli* basieren. Neben den bakteriell-basierten Methoden sind auch Verfahren verfügbar, die den Nachweis von Viren oder eukaryotischer Zellen nutzen.

Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft

Die Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften kann mit Hilfe einer Vielzahl von Techniken beschrieben werden. Im Nachfolgenden wird auf einige ausgewählte Methoden zur Erfassung der mikrobiellen Bakteriengemeinschaft eingegangen. Hierbei handelt es sich um die Techniken, die das größte Potenzial für MST-Studien haben.

Fingerprint-Methoden

Fingerprinting-Methoden werden häufig verwendet, um Änderungen in Bakteriengemeinschaften zu erfassen oder verschiedene Gemeinschaften miteinander zu vergleichen. Eine nicht DNA-basierte Technik stellt die PLFA-Analyse dar, die bereits in Kapitel 1.2.1.2 erläutert wurde. Bei den meisten Fingerprint-Methoden handelt es sich um DNA-basierte Verfahren. Es werden die Größen oder Konformationsprofile von Fragmenten erfasst, die durch eine PCR-Amplifikation von 16S rRNA-Genen oder zufällige Vervielfältigung gewonnen werden. Die Amplikons können z. B. anhand ihres Sequenz-spezifischen Schmelzverhaltens durch eine DGGE aufgetrennt werden (siehe Abschnitt DGGE in Kapitel 1.2.1.2). Zusätzlich kann einer der für die PCR-Amplifikation verwendeten Primer fluoreszenzmarkiert sein, und erhaltene Amplikons werden nach ihrer Größe aufgetrennt – entweder direkt nach der Amplifikation (Length Heterogeneity PCR, LH-PCR) oder nach einem Verdau mit Restriktionsenzymen (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLP bzw. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism, T-RFLP; (Liu et al., 1997). Die Amplifikation mit unspezifischen PCR-Primern aus Umweltproben resultiert im Allgemeinen in einer großen Anzahl von Banden, die durch Band-Matching-Computerprogramme und statistisch unter Verwendung von Clusteranalyse interpretiert werden. DNA-Banden können aus den Gelen

extrahiert und sequenziert werden, um relevante Mikroorganismen in der mikrobiellen Gemeinschaft zu identifizieren. Auf diese Weise konnten eine Vielzahl von wirtsspezifischen Sequenzen identifiziert werden (z. B. Bernhard und Field, 2000b; Weidhaas et al., 2010).

Methoden für die Untersuchung der Zusammensetzung der Gesamtbakteriengemeinschaft sind in MST-Studien nicht weit verbreitet. Der Einsatz dieser Methodik wird dadurch limitiert, dass die Bakterien mit fäkalem Ursprung nur einen sehr geringen Anteil an der Bakteriengemeinschaft in der betroffenen Wasserressource ausmachen (Farnleitner et al., 2005). Deshalb können die Untersuchungen zur bakteriellen Gemeinschaft nur bei sehr hohen mikrobiellen Fäkalbelastungen Informationen über den Verursacher liefern. Trotzdem sind einige Fälle, bei denen Fingerprint-Methoden zu einer Identifizierung von fäkalen Einträgen beitrugen, in der Literatur zu finden (siehe nachfolgende Tabelle).

Tabelle 1.2: Zusammenfassung ausgewählter Literatur zu Fingerprint-Analysen als Microbial Source Tracking-Werkzeuge.

Literatur	Methode	Erkenntnisse
Izbicki et al., 2009	PLFA	Sand konnte als Eintragsmedium für fäkale Wasserverschmutzungen an einem Strand identifiziert werden – und Seetang wurde ausgeschlossen.
Ballesté und Blanch, 2011	DGGE mit <i>Bifidobacteria</i> -spezifischen Primern	Identifizierung von <i>Bifidobacteria</i> sp., die mit Menschen und Schweinen assoziiert sind.
LaMontagne et al., 2003	T-RFLP	T-RFLP-Profile ermöglichten eine klare Differenzierung von Rinderdung, Hundekot und menschlichem Abwasser.
Fogarty und Voytek, 2005	T-RFLP mit <i>Bacteroides-Prevotella</i> -spezifischen Primern	T-RFLP-Profile ermöglichten eine klare Differenzierung von Fäkalien unterschiedlicher Herkunft (Huhn, Rind, Wild, Hund, Gans, Pferd, Mensch, Schwein, Möwe).
Ibekwe et al., 2016	T-RFLP	Identifizierung potenzieller Schadstofftransportwege durch Ähnlichkeitsanalysen von TRFLP-Gemeinschaftsprofilen von verschiedenen Probennahmestellen.
Field et al., 2003	LH-PCR und T-RFLP	Identifizierung von <i>Bacteroides</i> -DNA-Marker, die für Wiederkäuer und humanen Kot spezifisch sind. Die gleichen spezifischen Marker wurden in einem verschmutzten Gewässer nachgewiesen.

Klondatenbanken

Die Auflösung der Bakteriengemeinschaft auf einem hohen phylogenetischen Grad wird durch Pyrosequenzierung (Shendure und Ji, 2008) oder die Ermittlung der Sequenz eines Markergens aus dem Metagenom nach Klonierung, gefolgt von einer Sequenzierung, ermöglicht (Nocker et al., 2007), wobei das Metagenom sich auf das gesamte genetische Material einer Umweltprobe bezieht. Nach der Amplifikation des Markergens werden die PCR-Produkte in Plasmidvektoren kloniert und in einen *E. coli*-Stamm transformiert. Die Plasmide, die nun spezifische DNA-Fragmente umfassen, werden durch Anzüchten der transformierten *E. coli*-Zellen multipliziert und anschließend in großer Kopienzahl extrahiert. Nach der Ermittlung der DNA-Sequenzen erfolgt ein phylogenetischer Abgleich mit den verfügbaren Sequenzdatenbanken (Maidak et al., 2001).

Bislang wurde die Erstellung von Klondatenbanken vor allem für die Identifizierung von wirtsspezifischen Zielsequenzen in Hinblick auf die PCR-Analytik genutzt. Ein Beispiel ist eine Studie von Lu et al. (2008), in deren Rahmen eine Klondatenbank von Möwenfäkalien zur Ermittlung

einer Möwen-spezifischen Sequenz (*Catellibacterium marimammalium*) führte, die nachfolgend erfolgreich für MST-Studien angewandt wurde. Ähnliche Beispiele gibt es für Bakterien der Gattung *Bacteroides* (Dick et al., 2005a; Jeter et al., 2009). Aber Klondatenbanken wurden auch schon zur direkten Ermittlung von fäkalen Eintragsquellen herangezogen. So ergaben z. B. die Analysen von Klon-Datenbanken, die auf *Bacteroidales*-spezifischen Sequenzen beruhten, hohe Ähnlichkeiten für Rinderkotproben und Wasserproben, was eine Verschmutzung des Gewässers mit Viehfäkalien nahelegt (Lamendella et al., 2007).

Microarray

Mit Hilfe eines DNA-Chips (oft auch als DNA-Mikroarray oder DNA-Array bezeichnet) lassen sich viele verschiedene DNA-Abschnitte gleichzeitig detektieren. Die Genabschnitte, die erfasst werden sollen, werden zuerst synthetisch hergestellt und dann in Form winziger Punkte auf einem Trägermaterial gebunden (gespottet). Für die Analyse wird die DNA aus der zu untersuchenden Probe isoliert, mit einer Markierung (z. B. Fluoreszenzfarbstoff) versehen und auf den DNA-Chip aufgetragen. Sind entsprechende DNA-Stücke in der Probe vorhanden, lagern sich diese an die komplementären Vorlagen auf dem DNA-Chip an. Durch die angehängte Markierung können jene Genabschnitte identifiziert werden, bei denen es zu einer solchen Anlagerung gekommen ist.

Ein Beispiel für ein Microarray-System ist der PhyloChip, der von Forschern des Lawrence Berkeley National Laboratory entwickelt wurde. Dieser Microarray umfasst 16S rRNA-Sequenzen von fast allen bekannten Archaea und Bakterien, die in den öffentlichen Datenbanken zu finden sind (Brodie et al., 2006; Desantis et al., 2007; DeSantis et al., 2006). Spezifische Fallstudien mit dem PhyloChip-System zeigen, dass gemeinschaftsbasierte Analysen von kontaminierten Gewässern mit Microarray als MST-Werkzeuge genutzt werden können (Boehm et al., 2013; Li et al., 2016).

Next Generation Sequencing

Unter dem Namen Next Generation Sequencing (NGS) werden einige neuartige analytische Verfahren zusammengefasst, die eine sehr große Anzahl von DNA-Molekülen parallel sequenzieren können. Prinzipiell werden beim NGS verschiedene Methoden der so genannten klonalen Amplifikation eingesetzt, um Millionen von DNA-Fragmenten gleichzeitig zu vervielfältigen („massively parallel“). Die Stärke des NGS beruht somit auf dem hohen Durchsatz, der imstande ist, 10 Gigabasen oder mehr an Sequenz in einem einzigen Lauf zu erzeugen. NGS bietet neue Möglichkeiten für die Bewertung der Wasserqualität durch Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften auch unter dem Gesichtspunkt der Identifizierung von fäkalen Eintragsquellen. Bislang sind aber nur wenige Studien zum Einsatz von NGS für MST-Zwecke publiziert (z. B. Newton et al., 2011; Unno et al., 2012).

Molekularer Nachweis genetischer Marker

Diese Gruppe an Datenbank- und Kultur-unabhängigen Methoden nutzt zur Identifikation der Kontaminationsquelle spezifische, wirtsabhängige genetische Marker. Aus diesem Grund basieren die meisten verfügbaren Methoden auf PCR und quantitativen real-time PCR (qPCR) Verfahren.

Toxingene

Es ist bekannt, dass einige Toxingene von pathogenen Indikatorbakterien wirtsassoziiert sind (siehe Kapitel 1.2.2.1). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden wirtsspezifische PCR-Assays entwickelt, die auf den Nachweis von human- und Tier-spezifischen Toxingenen abzielen. Hier sind vor allem der Rinder-spezifische Nachweis des hitzelabilen Toxin IIA (LTIIA)-Gens und der Schweine-spezifische Nachweis des hitzestabilen Toxin II (STII) zu nennen (Khatib et al., 2002, 2003). Beide Assays zeigten keine Kreuzreaktivität für ein breites Spektrum an Kotproben. Allerdings weisen die Verfahren eine hohe Nachweisgrenze auf. Zur Verbesserung der Empfindlichkeit der Methoden wurden Nested-PCR-Ansätze entwickelt (Chern et al., 2004).

Auch für das hitzestabile Enterotoxin-Gen STI aus pathogenen *E. coli*-Bakterien, das mit fäkalen Kontaminationen durch menschliche Fäkalien in Zusammenhang gebracht wird, wurden PCR und Nested-PCR-Verfahren etabliert. Das Zielgen konnte in allen humanen Abwasserproben nachgewiesen werden, allerdings trat auch eine hohe Quote falsch-positiver Befunde auf (Field et al., 2003; Oshiro und Olson, 1997).

Weitere Nested-PCR-Verfahren, die den Nachweis von Kaninchen- (ralG-Gen), Vogel- (tsh-Ge) und Hunde- (papG III-Gen) spezifischen *E. coli*-Toxingenen erlauben, sind in der Literatur beschrieben (Jiang et al., 2007). Die Spezifität und Empfindlichkeit dieser Assays muss noch näher untersucht werden.

Neben den Toxingenen von *E. coli* ist auch ein Virulenzfaktor von Enterokokken als MST-Parameter im Gespräch. Ein Endpunkt-PCR-Verfahren, das die Amplifikation des Enterokokken-Oberflächenprotein (esp)-Gens von *E. faecium* erlaubt, wurde entwickelt, um Kontaminationen durch menschliche Fäkalien zu identifizieren (Scott et al., 2005). Dieses Verfahren verwendete einen Kultivierungsschritt, um die Anzahl der Zielzellen zu erhöhen. Obwohl die Methode in dieser ersten Studie eine hohe Sensitivität und Spezifität aufwies, konnte in weiteren Untersuchungen das esp-Gen auch im Kot anderer Tiere detektiert werden (Layton et al., 2009; Whitman et al., 2007). Eine modifizierte qPCR-Methode, die keinen Kultivierungsschritt erfordert, wurde entwickelt und geprüft (Ahmed et al., 2008c). Bei Untersuchungen mit Kotproben von Haus- und Wildtieren (zwölf Arten) wurde eine Spezifität von 100 % ermittelt. Abwasser konnte bis zu einer Verdünnung von 10^{-4} nachgewiesen werden. Insgesamt lag die Konzentration des esp-Gens immer 1-2 Log-Stufen unter der Enterokokkenzahl, die mittels Kulturverfahren erfasst wurde.

Metabolische Gene

Auch metabolische Gene können aufgrund von Unterschieden im Verdauungssystem, im Genotyp und in der Ernährung des Wirtes ein gewisses Maß an Wirtsspezifität aufweisen. Bislang wurden allerdings nur sehr wenige Studien in diesem Forschungsbereich durchgeführt. Ein mögliches Zielgen ist das Glucuronidase-Gen *uidA*. Der Nachweis, der für *E. coli* charakteristischen β -Glucuronidase, wird z. B. auch im Colilert-System (IDEXX-Laboratories) genutzt. Die Sequenzanalyse eines Fragments des *uidA*-Gens zeigte eine Wirtsspezifität (Ram et al., 2004). Die wirtsspezifischen Allele wurden verwendet, um human- und Vogel-spezifische MST-Assays zu entwickeln. Allerdings werden noch weitere Studien zur Prävalenz und Verteilung der Allele in Kot- und Umweltproben benötigt.

Gute Indikatoren für die Wasserverschmutzung durch Menschen, Wiederkäuer und Schweine sind Methanogene – eine Gruppe von *Archaea*. Die Gattung *Methanobrevibacter* gehört zur Ordnung *Methanobacteriales* und umfasst das humanspezifische Bakterium *Methanobrevibacter smithii* und das Wiederkäuer-spezifische Bakterium *Methanobrevibacter ruminantium*. Für humane Fäkalverunreinigungen wurde eine PCR-Methode entwickelt, die den Nachweis von *M. smithii* über das Gen *nifH* erlaubt (Ufnar et al., 2006). *M. smithii* ist im menschlichen Darm in einem Konzentrationsbereich von 10^7 - 10^{10} Zellen pro g Fäkalien vorhanden (Lin und Miller, 1998). Für den Nachweis von Verschmutzungen durch domestizierte Wiederkäuer wurde ebenfalls ein PCR-Assay etabliert. Dieser basiert auf der Detektion des *nifH*-Gens von *M. ruminantium* (Ufnar et al., 2007b). Die Erfassung von Kontaminationen verursacht durch Schweinedung soll durch den Nachweis des *mcrA*-Gens eines methanogenen Bakteriums, das für Schweine spezifisch ist, ermöglicht werden (Ufnar et al., 2007a). Alle Assays zeigten in ersten Untersuchungen eine gute Spezifität und erlaubten die Identifizierung von frischen Kontaminationen (Ufnar et al., 2006; Ufnar et al., 2007a; Ufnar et al., 2007b).

Faecalibacterium-spezifische DNA-Sequenzen

Faecalibacterium gehört zum Phylum *Firmicutes* und ist ein Gram-negatives, obligat-anaerobes Bakterium, das in menschlichen Fäkalien vorkommt (Dick et al., 2005a; Dick et al., 2005b). Bei der Auswertung einer 16S rRNA Klondatenbank von menschlichen Fäkalien zeigte sich, dass *Faecalibacterium* die häufigste Abundanz aufweist – gefolgt von *Bacteroides-Prevotella* (Zheng et al., 2009). Eine qPCR-Assay, die auf *Faecalibacterium* abzielt, lieferte nur für menschliches Fäkalmaterial und Abwasser sowie human beeinflusste Gewässer positive Befunde, aber nicht für andere tierische Proben (Zheng et al., 2009).

Rhodococcus coprophilus-spezifische DNA-Sequenzen

Rhodococcus coprophilus ist ein Actinomycet, der im Kot von Pflanzenfressern nachgewiesen werden kann (siehe Abschnitt 1.2.2.1). Es wurden PCR und qPCR-Assays für den Nachweis von *R. coprophilus* entwickelt. Mit Hilfe dieser Assays konnte das Bakterium im Dung von Rindern, Schafen, Eseln, Ziegen und Wild nachgewiesen werden. Für Kotproben von Menschen, Schweinen, Opossums, Enten und Hasen fielen die Befunde negativ aus (Glipin et al., 2002; Savill et al., 2001). Dieser Ansatz ermöglicht also den Nachweis von fäkalen Kontaminationen durch Pflanzenfresser, aber es kann nicht zwischen den einzelnen Tierarten unterschieden werden. Bislang wurde diese MST-Methode nur für Untersuchungen in Neuseeland eingesetzt (Savill et al., 2001).

Catellibacterium marimammalium-spezifische DNA-Sequenzen

Catellibacterium marimammalium ist ein Gram-positives Bakterium, das durch die Erstellung von Klondatenbanken von Möwenfäkalien als MST-Marker identifiziert wurde (Lu et al., 2008). Seine weite Verbreitung in Möwen und in Gewässern, die durch Möwen beeinflusst sind, macht es zu einem potenziellen Indikator für entsprechende Kontaminationen. Es wurde ein spezifischer qPCR-Assay für den Nachweis von *C. marimammalium* entwickelt (Lu et al., 2008). Untersuchungsergebnisse zeigen, dass dieser Assay nicht nur für Möwen, sondern auch für andere Seevögel positive Ergebnisse liefert. Außerdem wurde *C. marimammalium* auch in einem

geringen Maß im Kot einiger Warmblüter und Meeressäugetiere nachgewiesen, wobei die Kopienzahl deutlich geringer war als in Möwendung (4 Log-Stufen; Lu et al., 2008).

Wirtsspezifische *Bifidobacterium* sp.-Sequenzen

Bifidobacterium sp. sind Gram-positive Stäbchen, die mit dem menschlichen und tierischen Darm assoziiert sind. Molekulare Methoden wie die Nested-PCR und DGGE haben gezeigt, dass einige Bifidobakterien-Stämme wirtsspezifisch sind (Ballesté und Blanch, 2011). In menschlichen Fäkalien wurden neun verschiedene Spezies identifiziert. Diese Spezies umfassen u. a. *B. adolescentis*, *B. dentium* und *B. longum*, von denen angenommen wird, dass sie ausschließlich in humanem Abwasser auftreten (Bonjoch et al., 2004; Nebra et al., 2003). *B. adolescentis* erwies sich als die dominanteste *Bifidobacterium*-Spezies in der menschlichen Darmflora (Matsuki et al., 2004) und ist daher ein vielversprechender Kandidat zur Identifizierung humaner Eintragsquellen. Es wurde ein Nested-PCR-Ansatz für den Nachweis von *B. adolescentis* entwickelt, der einen ersten Amplifikationsschritt mit Primern, die universell an ausgewählte DNA-Sequenzen der Gattung *Bifidobacterium* binden, gefolgt von einem zweiten Amplifikationsschritt mit *B. adolescentis*-spezifischen Primern umfasst (Bonjoch et al., 2004). Bei entsprechenden PCR-Untersuchungen traten jedoch sowohl falsch-positive als auch falsch-negative Befunde auf. Um die Sensitivität und Stabilität des Assays zu verbessern, wurden neue gattungsspezifische Primer entworfen (King et al., 2007).

B. saeculare ist mit Geflügel und *B. pseudolongum* mit Rindern assoziiert, und einige nicht identifizierte Arten sind mit Schweinen verwandt (Ballesté und Blanch, 2011). Gómez-Doñate et al. (2012) entwickelten Sonden-basierte qPCR-Methoden für den Nachweis von wirtsassoziierten (Mensch, Rind, Schwein und Geflügel) Bifidobakterien. Die Untersuchungen von 25 Wasserproben unterschiedlicher Herkunft (städtische Abwässer, Abwässer aus Schweine-, Rinder- und Geflügel-Schlachthöfen sowie einem Oberflächengewässer) zeigten einen hohen Grad an Wirtsspezifität und keine Kreuzreaktivität (Gómez-Doñate et al., 2012).

Wirtsspezifische *Bacteroidales*-Sequenzen

Von den Intestinalbakterien, die eine Wirtsspezifität aufweisen, sind vor allem Bakterien der Gattung *Bacteroidales* häufig verwendete Parameter in MST-Studien. Bakterien der Gattung *Bacteroidales* machen etwa ein Drittel der menschlichen fäkalen Bakterienpopulation aus und ihre Konzentration liegt damit um 2-3 Log-Stufen höher als die der coliformen Bakterien. *Bacteroidales* kommen auch im Intestinaltrakt anderer Warmblüter vor (Meays et al., 2004), sind dort aber nicht so dominant wie beim Menschen. Bei Vogelarten wie Hühnern, Möwen oder Gänsen wird die Häufigkeit ihres Auftretens als gering angegeben (Kreder, 1995). Fast alle molekularen Nachweismethoden für *Bacteroidales* basieren auf dem 16S rRNA Gen. Die hohe Prävalenz von *Bacteroidales* im menschlichen Darm macht humanassoziierte *Bacteroidales*-Assays zu sehr empfindlichen MST-Werkzeugen.

1995 entwickelte eine amerikanische Wissenschaftlerin PCR-basierte Assays zur Amplifikation von Genen aus drei kultivierten *Bacteroides*-Stämmen zur Überwachung der fäkalen Belastung in verschiedenen Gewässern (Kreder, 1995). Zu Beginn des 21. Jahrhunderts wurden verschiedene fäkale DNA-Extrakte mittels LH-PCR und T-RFLP-Analysen auf 16S rRNA-Sequenzen von *Bacteroides-Prevotella* untersucht (Bernhard und Field, 2000a). Mit den aus

dieser Studie gewonnenen Erkenntnissen konnten Cluster-spezifische Primer ermittelt werden, die eine Diskriminierung zwischen menschlichen Fäkalien, Rinderdung und sonstigen Fäkalien erlaubten (Bernhard und Field, 2000b). Diese Primersysteme ermöglichten in weiterführenden Untersuchungen einen verlässlichen und spezifischen Nachweis der wirtsassoziierten Marker in Fäkalien und kontaminierten Wasserproben (Field et al., 2003).

Bis zum heutigen Tag wurde eine Reihe von *Bacteroides*-basierten PCR-Assays entwickelt, die den Nachweis von fäkalen Verunreinigungen durch Menschen, Hunde, Katzen, Wiederkäuern, Schweinen, Pferden, Elchen und Möwen erlauben. Dieses breite Spektrum an wirtsspezifischen Nachweissystemen ist insbesondere bei der Untersuchung von Einzugsgebieten hilfreich, bei denen die Wasserqualität durch mehr als eine Eintragsquelle beeinträchtigt wird.

Tabelle 1.3: *Bacteroidales*-basierte PCR-Assays in der Literatur.

Zielgen	Wirt	Literatur
16S rRNA Gen	Wirtsunspezifisch	Dick und Field, 2004; Kildare et al., 2007; Layton et al., 2006
16S rRNA Gen	Mensch	Bernhard und Field, 2000b; Kildare et al., 2007; Layton et al., 2006; Reischer et al., 2007; Seurinck et al., 2005
16S rRNA Gen	Wiederkäuer	Layton et al., 2006; Mieszkina et al., 2009; Reischer et al., 2006
16S rRNA Gen	Schwein	Dick et al., 2010; Mieszkina et al., 2009; Okabe et al., 2007
16S rRNA Gen	Pferd	Silkie und Nelson, 2009; Simpson et al., 2004
16S rRNA Gen	Hund	Dick et al., 2005a; Kildare et al., 2007
16S rRNA Gen	Katze	Dick und Field, 2004
16S rRNA Gen	Wild	Dick et al., 2005a
16S rRNA Gen	Vögel	Fremaux et al., 2010; Green et al., 2012
Membran-assoziierte und sekretorische Proteine	Rind	Shanks et al., 2006
Zelloberflächen-assoziierte Proteine	Mensch	Shanks et al., 2007
α -1-6 Mannanase Gen von <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Mensch	Xu et al., 2003; Yampara-Iquise et al., 2008

Neben den 16S rRNA-Gen-basierten PCR Assays wurden auch andere Gene für einen wirtsspezifischen Nachweis von *Bacteroidales*-Bakterien als mögliche Zielsequenzen identifiziert. Hierzu zählen Membran-assoziierte und sekretorische Proteine (Shanks et al., 2006), die die Unterscheidung von Rindern und anderen Wiederkäuern ermöglichen. Auch der spezifische Nachweis von *Bacteroides thetaiotaomicron*, eine vorherrschende Bakterienart in der menschlichen Darmmikrobiota (Kreider, 1995), über das α -1-6 Mannanase Gen wurde in verschiedenen Studien untersucht (Xu et al., 2003; Yampara-Iquise et al., 2008).

Die ersten molekularen Nachweise der wirtsspezifischen *Bacteroides*-Sequenzen wurden mittels Endpunkt-PCR durchgeführt. Auf diese Weise konnten aber nur Aussagen zur An- bzw. Abwesenheit der Zielsequenzen gemacht werden (Bernhard und Field, 2000a, 2000b; Dick et al., 2005a; Dick et al., 2005b). Es folgten quantitative PCR-Assays. Diese qPCR-Assays, die in den USA (Bernhard und Field, 2000a, 2000b; Dick und Field, 2004; Kildare et al., 2007) entwickelt wurden, haben sich in mehreren europäischen Ländern bewährt (Gawler et al., 2007), zeigten aber eine relativ geringe Sensitivität in Spanien (Ballesté et al., 2010), in Australien (Ahmed et

al., 2009a; Ahmed et al., 2009b) und in Kenia (Jenkins et al., 2009). Ob PCR-Systeme für die Untersuchung geeignet sind, muss im Einzelfall überprüft werden.

Die Anzahl an spezifischen *Bacteroidales*-basierten PCR-Assays ist stetig gestiegen, wobei die Spezifität des Nachweises je nach Assay variiert. Insgesamt muss die Methodenvvalidierung für diese Datenbank-unabhängigen Methoden noch weiter vorangetrieben werden. In den vergangenen Jahren wurde eine Vielzahl von MST-Studien durchgeführt, bei denen *Bacteroidales*-basierte PCR-Methoden eingesetzt wurden. In Österreich konnten für ein alpines Karstsystem Wiederkäuer wie Gämsen und Rehwild als Haupteintragsquelle identifiziert werden (Reischer et al., 2008). Auch bei der Untersuchung von Oberflächengewässern lieferten die Methoden wichtige Hinweise auf die Verursacher der Kontaminationen (z. B. Marti et al., 2013; Mieszkina et al., 2009; Ohad et al., 2015).

Virale Marker

Die humanen Enteroviren, Adenoviren und Polyomaviren und ein Pflanzenvirus haben wegen ihrer hohen Abundanz im Kot und im Urin, ihrer hohen Persistenz in der aquatischen Umwelt sowie ihrer Wirtsspezifität große Beachtung als Datenbank-unabhängige mikrobielle Marker von menschlichem Abwasser gefunden (Wong et al., 2012). Da der molekularbiologische Nachweis von Viren wesentlich weniger zeit- und kostenintensiv ist wie ihr Nachweis mittels Zellkulturverfahren, haben sich die PCR-basierten Nachweisverfahren für Viren in MST-Studien durchgesetzt.

Da die Anzahl an enterischen Viren in der aquatischen Umwelt meist sehr niedrig ist, werden häufig große Mengen an Wasser (bis zu mehreren tausend Litern) vor der Analyse durch molekulare Methoden konzentriert (Griffin et al., 1999; Lipp et al., 2001a; van Heerden et al., 2003). Hierzu stehen verschiedene Arten von Filtern (z. B. positiv- oder negativ-geladene Filter, Glasfaser-Filter, Glaswolle) und Filtrationsverfahren (z. B. Wirbelstromfiltration, Tangentialströmungsfiltration) zur Verfügung (Griffin et al., 2003; Jiang et al., 2001; Lipp et al., 2001b; van Heerden et al., 2003).

Studien zeigen, dass der Nachweis von humanen Enteroviren (HEV) und Adenoviren (HAdVs) ein vielversprechendes Werkzeug zur Erfassung von Kontaminationen durch humanes Abwasser bzw. zur Unterscheidung zwischen tierischen und menschlichen Verschmutzungen ist (Noble et al., 2003; Pina et al., 1998). Allerdings muss beim Nachweis von viralen Markern berücksichtigt werden, dass im Allgemeinen nur ein kleiner Prozentsatz der Population durch diese Viren infiziert ist und sie ausscheidet. Dies erschwert die Detektion dieser pathogenen Viren in der Umwelt deutlich. Bestimmte nicht-pathogene Viren, wie z. B. humane Polyomaviren (HPyVs), haben eine weitaus größere Verbreitung. HPyVs wie die Spezies BKV und JCV kommen ebenso wie die klassischen enterischen Viren im städtischen Abwasser vor (Bofill-Mas et al., 2000). JCV und BKV werden über den Urin-oralen Weg verbreitet, so dass man sie nicht zu den traditionellen enterischen Viren zählt. Serologische Studien berichten, dass zwischen 60-90 % der erwachsenen Bevölkerung Antikörper gegen JCV und BKV tragen (Hirsch und Steiger, 2003; Polo et al., 2004). Das rührt daher, dass häufig eine asymptomatische Primärinfektion mit Polyomaviren während der Kindheit auftritt, gefolgt von latenten Infektionen im Nierengewebe, die unbegrenzt persistieren können (Dörries, 1998). Eine Erkrankung tritt nur auf, wenn das

Immunsystem des Wirts durch Krankheiten supprimiert wird (White et al., 2005). Die humanen Polyomaviren werden sowohl von gesunden als auch immungeschwächten Individuen mit dem Urin und z. T. auch dem Kot ausgeschieden (Bialasiewicz et al., 2009; Zhong et al., 2007).

2003 wurde von McQuaig et al. ein PCR-Assay zum Nachweis von JCV und BKV etabliert, der in den vergangenen Jahren von einer Vielzahl von Arbeitsgruppen für MST-Studien eingesetzt wurde (z. B. Ahmed et al., 2009b; Fongaro et al., 2012; Gordon et al., 2013; Harwood et al., 2009). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen belegen den Nutzen der Polyomaviren als molekulare Marker für die mikrobiologische Wasserqualität und als MST-Werkzeuge zur Unterscheidung von humanen und nicht-humanen Kontaminationen in Umweltproben. Ein großes Potenzial als Indikatoren für fäkale Verschmutzungen tierischen Ursprungs haben verschiedene tierpathogene Viren (siehe nachfolgende Tabelle).

Tabelle 1.4: Tier-assoziierte virale genetische Marker in der Literatur.

Virus	Literatur
Porziner Adenovirus (PAdVs)	Hundesa et al., 2006; Hundesa et al., 2009; Hundesa et al., 2010; Wolf et al., 2010
Boviner Adenovirus (BAdVs)	Ahmed et al., 2010a; Ahmed et al., 2013; Hundesa et al., 2006; Wolf et al., 2010; Wong und Xagorarakis, 2010; Wong und Xagorarakis, 2011
Oviner Adenovirus (OAdVs)	Wolf et al., 2010
Boviner Enterovirus (BEVs)	Fong et al., 2005; Ley et al., 2002
Boviner Polyomavirus (BPVs)	Hundesa et al., 2006; Hundesa et al., 2009; Hundesa et al., 2010; Rusiñol et al., 2013; Wong und Xagorarakis, 2011
Boviner Norovirus (BNoVs)	Wolf et al., 2010
Oviner Norovirus (ONoVs)	Wolf et al., 2010
Hühner/Truthähne-infizierender Parvovirus (ChPVs/TuPVs)	Carratalà et al., 2012
Atadenovirus (AtAdVs umfassen Adenoviren, die Schweine, Rinder, Wild und Hunde infizieren)	Jiménez-Clavero et al., 2003
Porziner Teschovirus (PTVs)	Jiménez-Clavero et al., 2003

Insgesamt zeigen die Untersuchungen, dass die oben genannten viralen Marker sehr spezifische Parameter für die Erfassung und Identifizierung von tierischen Verunreinigungen – insbesondere durch Schweine, Rinder, Schafe und Geflügel – in der aquatischen Umwelt sind.

Bei der Auswertung von Metagenom-Datenbanken aus humanen Fäkalien konnten übereinstimmende Sequenzen ermittelt werden, die einem bislang nicht identifizierten Bakteriophagen zugeordnet werden (Dutilh et al., 2014). Dieser Bakteriophage wurde als CrAssphage bezeichnet und in die Gruppe der *Bacteroides*-Phagen eingeordnet (Dutilh et al., 2014). Eine nachfolgende Studie ergab, dass der CrAssphage im Abwasser in den USA und Europa in hohen Konzentrationen vorkommt, wohingegen er im Abwasser aus Asien und Afrika seltener auftritt (Dutilh et al., 2014). Der CrAssphage konnte in Tierfäkalien mit Ausnahme von Fledermaus-Kot bislang nicht nachgewiesen werden. Daraus schlussfolgerten Stachler und Bibby (2014), dass CrAssphage-basierte MST-Methoden für die Identifizierung humaner Einträge geeignet sein könnten. In Folge dessen wurden PCR-Assays für den Nachweis des Phagen entwickelt und evaluiert (Stachler et al., 2017). Diese Assays zeichnen sich durch eine hohe Spezifität für menschliche Fäkalien aus (98,6 %) und waren in unbehandeltem kommunalen Abwasser und entsprechend kontaminierten Gewässern häufig nachweisbar (Ahmed et al., 2018; Stachler et al., 2017).

Mitochondriale DNA

Neben den Nukleinsäuren von fäkalen Mikroorganismen oder Krankheitserregern können auch die Nukleinsäuren von eukaryotischen Wirtszellen als Zielparameter für MST Untersuchungen genutzt werden. Der Nachweis dieser Wirtszellen basiert auf der mitochondrialen DNA (mtDNA).

Mitochondrien sind Zellorganellen, die in den Zellen der meisten Eukaryoten vorkommen und eine wichtige Rolle bei der aeroben Energieproduktion spielen. Die Anzahl der Mitochondrien in einer Zelle und die Kopienzahl der Genome können stark variieren und sind vom Zelltyp und seinem physiologischen Zustand abhängig (Alberts et al., 2002). In Rattenleberzellen wurden z. B. 1.400-2.200 Mitochondrien pro Zelle und 5-10 Genome pro Mitochondrium gefunden (Bogenhagen und Clayton, 1974). Das mitochondriale Genom enthält u. a. Art-spezifische Sequenzen. Die mitochondrialen Genome von Wirbeltieren (wie Vögel, Säugetiere und Fische) haben eine Größenordnung von 16.000-17.000 bp. Erhebliche Unterschiede in der mtDNA-Sequenz können bereits bei sehr nah verwandten Arten gefunden werden. Zum Beispiel gibt es bei Menschen und Schimpansen nur eine 91 %-ige Übereinstimmung des mitochondrialen Genoms (Arnason et al., 1996). Diese Unterschiede in den Sequenzen ermöglichen die Identifizierung von Primersystemen, die einen Spezies-spezifischen Nachweis mittels molekularer Methoden ermöglichen. Die genannten Eigenschaften machen mitochondriale DNA-Sequenzen zu ausgezeichneten MST-Parametern.

Veröffentlichungen zufolge werden ca. 10^7 Darmzellen pro g Fäzes ausgeschieden (Kamra et al., 2005). Unter der Annahme, dass pro Zelle im Schnitt 10^4 Genome vorliegen, würden 10^{11} Genome pro g Fäzes ausgeschieden werden. Dies konnte durch Untersuchungen von Kotproben mittels PCR allerdings nicht bestätigt werden. Hier wurden Werte im Bereich von 10^7 Kopien pro g Fäzes ermittelt (Caldwell et al., 2007; Schill und Mathes, 2008). Dieser große Unterschied zwischen theoretischer und gemessener Kopienzahl kann in der Abnahme der Mitochondrienzahl während der Darmpassage sowie einer Überschätzung der mitochondrialen Genome pro Zelle begründet sein.

Die ersten MST-Methoden, die auf eukaryotische Markergene abzielten, waren Endpunkt-PCR-Assays zum Nachweis des humanen mitochondrialen NADH-Dehydrogenase-Gens (Martellini et al., 2005). Ihnen folgten Multiplex-PCR-Formate zur parallelen Detektion von spezifischen mtDNA-Sequenzen von Menschen, Rindern, Schafen und Schweinen. Mehrere Arbeitsgruppen haben die Endpunkt-PCR-Methoden in qPCR-Verfahren überführt. 2007 entwickelten Wissenschaftler eine Triplex-PCR zum Nachweis der mtDNA von Mensch, Rind und Schwein (Caldwell et al., 2007). Schill und Mathes (2008) ermittelten mtDNA-Primer-Sequenzen, die für Hund, Rind, Huhn, Schaf, Pferd, Schwein, Kanada-Gans, Weißwedelhirsch und Mensch spezifisch sind. Auch weitere Studien etablierten qPCR-Verfahren zum Nachweis fäkaler Verunreinigungen durch Menschen und eine Vielzahl verschiedener Tierarten (Baker-Austin et al., 2009; Baker-Austin et al., 2010; Kortbaoui et al., 2009). Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, dass auf Basis von mtDNA-Sequenzen sowohl hochspezifische Primer als auch Oligonukleotide, die den Nachweis eines größeren Clusters von relevanten Organismen (z. B. alle domestizierten Tiere) erlauben, ermittelt werden können. Aufgrund einiger falsch-negativer Ergebnisse bemerkten die Autoren, dass die Konzentration an mtDNA in den Proben ein limitierender Faktor für den Nachweis dieser Marker ist. Einige falsch-positive Ergebnisse für den Rinder-spezifischen mtDNA-Marker wurden

auch bei der Untersuchung von menschlichem Kot festgestellt. Dies wurde auf den Verzehr von Rindfleisch durch den Menschen zurückgeführt.

1.2.3 Source Tracking mit chemischen Substanzen

Während diese Arbeit sich auf Source-Tracking-Werkzeuge und -Ansätze konzentriert, die auf dem Nachweis von Mikroorganismen zur Identifizierung von Kontaminationsquellen basieren, soll nicht unerwähnt bleiben, dass auch chemische Ansätze Anwendung finden.

In der Vergangenheit wurden Abwasser-assoziierte anorganische Ionen wie Natrium, Chlorid, Kalium, Gadolinium oder Bor verwendet, um die anthropogene Belastung von Gewässer zu erfassen (Bassett et al., 2002; Vengosh et al., 1994; Verplanck et al., 2005). Im Gegensatz zu der vergleichsweise begrenzten Anzahl an anorganischen Ionen gibt es ein breites Spektrum an organischen Verbindungen, die durch anthropogenen Aktivitäten freigesetzt werden. Hierzu zählen u. A. Pestizide, Pharmazeutika und Körperpflegeprodukte (Khazaei und Milne-Home, 2017). Für die meisten dieser Verbindungen ist der natürliche Hintergrund vernachlässigbar oder gar nicht vorhanden, da es keine nicht-anthropogenen Quellen gibt. Bereits in den späten 1960er Jahren wurde die Verwendung von Coprostanol als ein organischer Indikator zur Verfolgung von fäkalen Verschmutzungen eingeführt. Coprostanol kann im Kot von Warmblütern, aber auch von Vögeln nachgewiesen werden; und ermöglicht daher keine Unterscheidung zwischen humaner und nicht-humaner Herkunft (Murtaugh und Bunch, 1967). In den letzten Jahren werden Humanpharmazeutika und Lifestyle-Produkte wie künstliche Süßstoffe und Nikotin für die Herkunftsbestimmung von Kontaminationen genutzt (Warner et al., 2019). In der nachfolgenden Tabelle sind einige der Substanzen, die am häufigsten für entsprechende Untersuchungen genutzt werden, aufgelistet.

Tabelle 1.5: Überblick über häufig genutzt chemische Indikatoren für die Herkunftsbestimmung.

		Literatur
Häusliches Abwasser	Aminotrizoesäure, Iothalamsäure, Iomeprol, Iopamidol (Röntgenkontrastmittel)	Wolf et al., 2012
	Carbamazepin, Primidon (Antiepileptika)	McCance et al., 2018
	Oxipurinol (Wirkstoff gegen Gicht und Nieren- bzw. Harnsteine)	Funke et al., 2015
	Atenolol (Blutdrucksenker)	McCance et al., 2018
	Sulfamethoxazol (Antibiotika)	Wolf et al., 2012
	Acesulfam, Sucralose, Cyclamat, Saccharin (Süßstoffe)	McCance et al., 2018; Yang et al., 2018
Unbehandeltes Abwasser	Sulfaminsäure (Transformationsprodukt von Acesulfam und Entkalkungsmittel)	Jmaiff Blackstock et al., 2019
	Paraxanthin (Transformationsprodukt von Koffein)	Hillebrand et al., 2012.
	Koffein	Buerge et al., 2003, 2006; Kurissery et al., 2012; Sievers et al., 1977
	Ibuprofen, Paracetamol (Schmerzmittel)	Heberer, 2002
Oberflächenabfluss urban	Cyclamat, Saccharin (Süßstoffe)	Buerge et al., 2009; Lange et al., 2012; Zirlewagen et al., 2016
	Valsartan, Valsartansäure (Blutdrucksenker und Transformationsprodukt)	Nödler et al., 2013; Nödler et al., 2016
	Nikotin	Roder Green et al., 2014
	Mecopropoester (Durchwurzelungsschutz in Bitumendächern)	Burkhardt et al., 2007; Burkhardt et al., 2011
Oberflächenabfluss landwirtschaftlich	Isoproturon, Terbutryn, Carbendazim (Herbizid, Algenschutz von Häuserfassaden)	Burkhardt et al., 2007; Burkhardt et al., 2011
	Pestizide (z. B. Glyphosat)	Wittmer et al., 2011
Intensivtierhaltung	Sulfadiazin, Sulfamethazin (Antibiotika)	Hirsch et al., 1999; Lindsey et al., 2001

Die wesentlichen Vorteile dieses Ansatzes zum Source Tracking sind, dass viele der chemisch-analytischen Verfahren standardisiert sind und die Chemikalien häufig geographisch und zeitlich stabiler sind (Warner et al., 2019). Allerdings liegt die Konzentration dieser Chemikalien oft unter der Nachweisgrenze, sobald die in die Gewässer gelangen (Warner et al., 2019).

1.3 Antibiotikaresistenzen in der Umwelt

Die Entdeckung antibiotisch wirksamer Substanzen sowie deren industrielle Herstellung in großem Umfang revolutionierte die Behandlung von Infektionskrankheiten. Die zunehmende Anwendung von Antibiotika in der Human- und Veterinärmedizin führte aber in den letzten Jahren zu einer besorgniserregenden Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen im medizinischen Bereich. Oftmals zeigen Antibiotika keinen therapeutischen Effekt mehr, da die Krankheitserreger resistent geworden sind. Die World Health Organisation beschreibt das Auftreten und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen als globales Problem, mit dem die Menschheit in Zukunft in verstärktem Maße konfrontiert sein wird (World Health Organisation (WHO), 2014).

Antibiotika sind Wirkstoffe, die das Wachstum von Bakterien hemmen bzw. diese abtöten. Es handelt sich hierbei um eine heterogene Gruppe von Wirkstoffen. Grundsätzlich unterscheiden sich die verschiedenen Substanzen in ihren Wirkungsmechanismen und dem Spektrum der Erreger, gegen die sie wirksam sind.

Antibiotika greifen die Zellen der Mikroorganismen gezielt an ganz bestimmten Wirkungsorten an bzw. hindern den Keim an Stoffwechselschritten. Die Bildung von Resistenzen ist ein natürlicher Effekt der Evolution. Durch geringfügige Mutation (Veränderung) des Wirkungsortes oder des Stoffwechselweges, ist es dem Keim möglich, dem Angriff der Antibiotika zu entgehen und zu überleben. Es gibt natürliche Resistenzen, die dazu führen, dass ein Antibiotikum gegen eine bestimmte Bakterienspezies nicht wirkt und daher nicht eingesetzt werden kann. Darüber hinaus entwickeln sich Resistenzen insbesondere dort, wo Antibiotika eingesetzt werden, da sie dort einen Selektionsvorteil darstellen (Umweltbundesamt (UBA), 2018). Hierbei können die Bakterien eine Resistenz durch Mutation sowie durch Gentransfer erwerben. Im Gegensatz zu höheren Lebewesen können Mikroorganismen Teile ihres genetischen Materials auch über Art- und Gattungsgrenzen hinweg austauschen. Diese horizontale Resistenzübertragung ist für die Ausbreitung besonders wichtig, da ein Austausch zwischen pathogenen und nicht-pathogenen Organismen erfolgen kann und horizontaler Gentransfer genannt wird. Der horizontale Gentransfer ist wesentlich für die gegenwärtige Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen verantwortlich, aber auch generell ein zentrales Element in der Evolution von Bakterien.

Antibiotika werden sowohl in der Human- als auch Tiermedizin seit Jahrzehnten eingesetzt. In der Humanmedizin nehmen Antibiotika seit vielen Jahren eine Spitzenposition unter den verordnungsstärksten Wirkstoffgruppen ein (GERMAP, 2015). Ein Bericht schätzt den deutschen Antibiotikaverbrauch in der Humanmedizin auf insgesamt 700-800 t pro Jahr, wobei rund 85 % auf Verordnungen im ambulanten Bereich entfallen. Schon lange ist die Humanmedizin nicht mehr das einzige Anwendungsgebiet für Antibiotika. Antibiotika finden auch in der Veterinärmedizin vielfältige Anwendung. Sie werden kranken Tieren zu therapeutischen Zwecken verabreicht, aber auch zur Prophylaxe, wenn beispielsweise Tiere aus verschiedenen Ställen zusammengestellt werden sollen und die Gefahr von Krankheitseinschleppung durch einzelne Tiere besteht. Den Tieren wird das Antibiotikum ins Futter gemischt oder gespritzt.

Antibiotika und antibiotikaresistente Bakterien werden über die Ausscheidungen von Mensch und Tier und durch unsachgemäße Entsorgung in die Umwelt eingetragen. Die Tatsache, dass z. T. bis zu 90 % des eingenommenen Antibiotikums unverändert wieder ausgeschieden wird, macht die Problematik deutlich. Die ausgeschiedenen Antibiotika, deren Metabolite und die antibiotikaresistenten Bakterien gelangen über den Abwasserpfad in die Kläranlagen. Dort werden sie während der Abwasserreinigung jedoch nicht vollständig entfernt und erreichen so die Oberflächengewässer (Alexander et al., 2016; Berendonk et al., 2015). Außerdem werden tierische Exkremente oder Gülle auf Felder ausgetragen und führen zu einer zusätzlichen Belastung von Böden und auch Gewässern.

Die Zusammenhänge der Entstehung und Verbreitung von Antibiotikaresistenzen sind sehr komplex und werden von vielen Faktoren beeinflusst (Berendonk et al., 2015). Im Bereich der hygienischen Parameter zur Erfassung der Wasserqualität sind Antibiotikaresistenzen in den

vergangenen Jahren immer mehr in den Fokus gerückt. Hintergrund hierfür sind unter anderem die alarmierenden Berichte der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation (WHO), 2014). Klinisch relevante Antibiotikaresistenzgene und antibiotikaresistente Bakterien, die aus anthropogenen und tierischen Quellen freigesetzt werden, sind ein ernstes Gesundheitsproblem (Ashbolt et al., 2013). Die weltweite Ausbreitung von antibiotikaresistenten Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen sowie der Erwerb von Resistenzen bei klinisch-relevanten Bakterien sind mit zunehmenden Krankenhausaufenthalten und Sterblichkeitsraten bei Patienten verbunden, die mit solchen Erregern infiziert sind (World Health Organisation (WHO), 2014). Infolgedessen wird die Behandlung von Infektionskrankheiten schwieriger, und die Zahl der Todesfälle im Zusammenhang mit antibiotikaresistente Infektionen steigt weltweit an. Der hohe Einsatz von Antibiotika in der Human- und Tiermedizin hat weltweit zur Entstehung, Selektion und Verbreitung von antibiotikaresistenten Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen in verschiedenen Umweltkompartimenten wie Oberflächengewässer (Stange et al., 2016; Stoll et al., 2012) und Grundwässern (Szekeres et al., 2018; Zhang et al., 2009b) geführt.

Ein wichtiger Schritt, um die Ausbreitung von antibiotikaresistenten Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen in der Umwelt besser zu verstehen und auch zu verhindern, ist die Identifikation ihrer Eintragswege (Bengtsson-Palme et al., 2018). Daher ist eine Verknüpfung des Nachweises von Antibiotikaresistenzen mit MST-Untersuchungen naheliegend.

2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Die derzeit zur Qualitätskontrolle angewendeten mikrobiologischen Methoden sind geeignet, eine Beeinträchtigung durch Fäkaleinträge nachzuweisen, geben jedoch keinen Aufschluss über die Herkunft dieser Kontamination. Für die Durchführung zielgerichteter Schutzmaßnahmen, z. B. im Rahmen des Water Safety Plans, ist diese Information aber essentiell. Die Implementierung von effizienten Maßnahmen zur Verbesserung der mikrobiologischen Rohwasserqualität erfordert die Identifizierung der Eintragsquellen.

Zum Zwecke des MST können verschiedene mikrobiologische bzw. molekularbiologische Untersuchungsmethoden angewendet werden. Einige Methoden basieren auf genetischen Biomarkern auf dem 16S rRNA-Gen, der in Fäkalien nachweisbaren Bakterien *Bacteroides*. Andere Methoden nutzen den Nachweis von Spezies oder Stämmen von Mikroorganismen und Bakteriophagen sowie Mitochondrien, die als spezifische Indikatoren für den Ursprung dienen können. Der Fokus in dieser Arbeit wurde auf PCR-Methoden gelegt, da diese nach erfolgreicher Etablierung mit vertretbarem Aufwand durchführbar sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden molekularbiologische Werkzeuge zur Identifizierung von fäkalen Einträgen im Einzugsgebietsmaßstab entwickelt und geprüft. Hierzu wurden verschiedene Datenbank-unabhängige MST-Werkzeuge verglichen. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass vor allem die neueren Datenbank-unabhängigen Verfahren, die auf dem molekularen Nachweis von wirtsspezifischen genetischen Markern beruhen, sehr vielversprechende Methoden sind. Der Einsatz dieser Methoden gewinnt zunehmend an Popularität. Zurzeit wird vor allem in den USA, aber auch in Australien, Spanien, Portugal und Österreich die Entwicklung der Datenbank-unabhängigen Verfahren vorangetrieben. Wichtige Vorteile dieser Methoden sind:

- Es sind keine Kultivierungsschritte notwendig.
- Der molekularbiologische Nachweis kann sehr schnell erfolgen (innerhalb eines Arbeitstages).
- Es wird keine große Datenbank zum Vergleich benötigt.
- Die Proben können nach einer einfachen Aufbereitung über einen längeren Zeitraum gelagert werden.
- Die Methoden zeichnen sich durch eine hohe Spezifität aus.
- Es ist eine Unterscheidung von humanen und tierischen Einträgen möglich.
Zusätzlich können tierische Einträge noch weiter differenziert werden.

Vor diesem Hintergrund wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt, bei denen unterschiedliche MST-Verfahren zum Einsatz kamen.

Das Gesamtziel der Arbeit war die Entwicklung und Prüfung neuer Methoden zur Identifizierung von fäkalen Eintragsquellen im Einzugsgebietsmaßstab. Die Praxistauglichkeit der neuen molekularbiologischen Marker wurde in Bezug auf Spezifität, Sensitivität und Stabilität beurteilt. Als Ergebnis sollten Empfehlungen zu gezielten Managementmaßnahmen im Einzugsgebiet

abgeleitet werden. Zusätzlich wurde der Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen im Rohwasser mit MST-Verfahren gekoppelt. Es wurde geprüft, ob diese molekularbiologischen Werkzeuge zusätzlich spezifische Informationen zu den Ausbreitungspfaden von Antibiotikaresistenzen liefern können.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Monitoring mikrobiologischer Parameter – Kulturverfahren

3.1.1 Coliforme Bakterien und *Escherichia coli*

E. coli und coliforme Bakterien in Proben aus den Untersuchungsgebieten wurden mit dem Colilert®-18 der Firma IDEXX Laboratories erfasst. Das Nachweisverfahren beruht auf der Aktivität spezifischer Gene, wobei die Anzahl der Bakterien mittels statistischer Verfahren (Most Probable Number, MPN) ermittelt wird. Die Durchführung orientierte sich an den Herstellerangaben.

Für die Kultur-abhängigen Untersuchungen im Rahmen der Stabilitätsversuche wurde das Verfahren nach DIN ISO 16649-1:2009-12 eingesetzt. Jede der Proben wurde als Duplikat über eine Membran filtriert, die anschließend für 3-5 h bei 36-38 °C auf Mineralien-modifiziertem Glutamat-Agar (Merck) inkubiert wurden. Im Anschluss wurden die Membranen auf Platten mit Trypton-Galle-X-Glucuronid-Medium (Merck) überführt und erneut bei 43-45 °C für 18-24 h inkubiert. Die blauen Kolonien wurden ausgezählt.

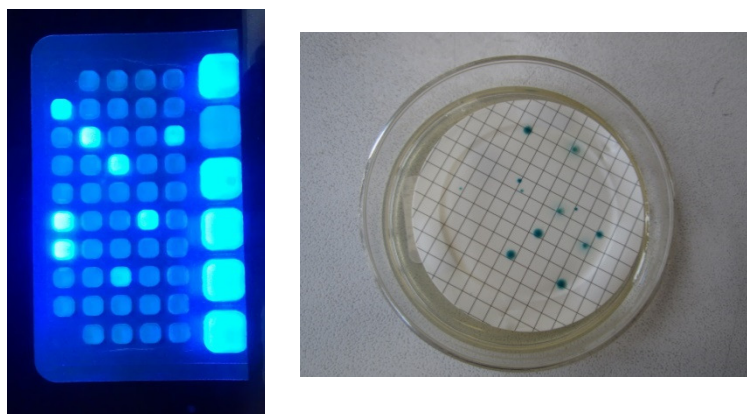


Abbildung 3.1: Kulturnachweis β -Glucuronidase positiver *E. coli*-Bakterien im Colilert®-18-System der Firma IDEXX Laboratories (links) und im DIN ISO-Verfahren 16649-1 (rechts).

Für die Datenbank-unabhängige aber Kultur-abhängige MST-Untersuchungen wurden coliformen Bakterien und *E. coli* aus Oberflächenwasserproben isoliert. Hierzu wurde Lactose-TTC-Agar (Merck) genutzt. Die Platten wurden für 24 h bei 37 °C inkubiert. Einzelne gut isolierte gelb-orange Kolonien wurden isoliert. Diese Isolate wurden mittels biochemischen Teststreifen API 20E (BioMérieux) untersucht.

3.1.2 Enterokokken

Im Rahmen des Projektes erfolgte der Nachweis von Enterokokken in Umweltproben mit Hilfe des von IDEXX Laboratories entwickelten Quanti-Tray®-Systems. Hierzu wurde das Enterolert®-System verwendet. Die Durchführung orientierte sich an den Herstellerangaben.

Für die Stabilitätsversuche wurden Enterokokken über das Verfahren nach DIN EN ISO 7899-2:2000-11 nachgewiesen. Die Proben wurden sowohl verdünnt als auch unverdünnt filtriert und die Membranfilter auf Slanetz-und-Bartley-Agar (Oxoid) bei 24-28 °C für 40-48 h inkubiert. Die Filter mit rötlichen, bräunlichen oder pinkfarbenen Kolonien wurden auf Platten mit Galle-Äsculin-Azid-Agar (Merck) überführt und nach 20 min ausgewertet. Alle Kolonien, die im Medium eine Schwarzfärbung verursachten, wurden als positiv gewertet.

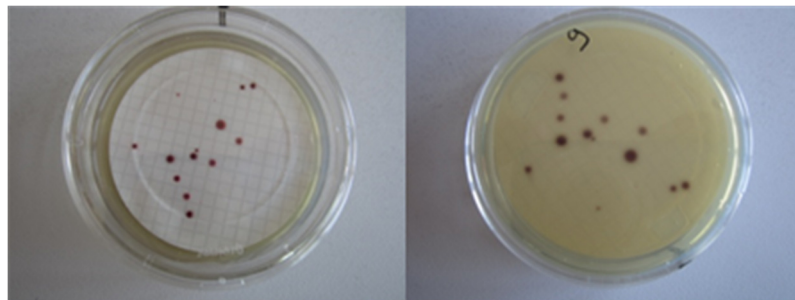


Abbildung 3.2: Kulturnachweis von Enterokokken nach DIN ISO 7899-2.

3.1.3 *Clostridium perfringens*-Sporen

In den Stabilitätsversuchen wurden Sporen des Bakteriums *C. perfringens* mit dem Verfahren nach DIN EN ISO 14189:2016-11 nachgewiesen. *C. perfringens* bildet auf Tryptose-Sulfit-Cycloserin-Agar (Merck) schwarze oder grau bis gelb-braune Kolonien. Die Proben wurden bei 60 °C für 15 min im Wasserbad inkubiert und anschließend als Duplikate über eine Membran filtriert. Die Membranen wurden anaerob auf Tryptose-Sulfit-Cycloserin-Agar-Platten bei 43-45 °C für 18-24 h inkubiert. Alle schwarzen oder grauen bis gelb-braunen Kolonien wurden gezählt und auf DEV-Agar (Merck) subkultiviert (anaerob, 34-38 °C, 18-24 h). Die gewachsenen Kolonien wurden auf einen Filter übertragen und mit zwei bis drei Tropfen Azid-Phosphatase-Reagenz beträufelt. Eine (leicht) rötlich-violette Färbung wurde als positiv gewertet.

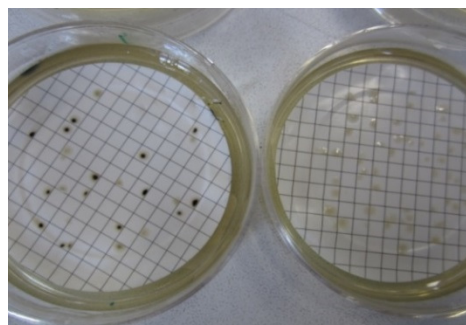


Abbildung 3.3: Kulturnachweis von *Clostridium perfringens* nach DIN EN ISO 14189:216-11.

3.2 Molekularbiologische Analytik

3.2.1 PCR-Untersuchung von *E. coli*-Isolaten auf Virulenzgene

Für die Untersuchungen von isolierten Einzelkolonien wurde unter Verwendung von DNeasy-Tissue and Blood Kit (Qiagen) gemäß Herstelleranweisungen genomische DNA isoliert. Die Integrität der extrahierten DNA wurde mit universellen, bakteriellen Primern 27f und 1492r überprüft. Die DNA-Extrakte wurden bis zur PCR-Analyse bei -20 °C gelagert.

Die mittels API-System identifizierten *E. coli*-Isolate wurden mittels PCR-Amplifikation des *uidA*-Gens in Anlehnung an Frahm et al. (2003) verifiziert. Die verifizierten *E. coli*-Stämme wurden unter Verwendung einer Triplex-PCR, basierend auf der An- bzw. Abwesenheit von drei DNA-Fragmenten *chuA*, *yjaA* und *TspE4C2*, in vier phylogenetische Gruppen eingeordnet (Clermont et al., 2000). Die PCR-Amplifikation wurde in 20 µL Reaktionsansätzen durchgeführt. Die Reaktionen setzten sich wie folgt zusammen: 1 x Puffer mit Magnesiumchlorid (Molzym), 200 µM dNTPs (Carl Roth), 0,5 µM Primer (Invitrogen), 2 U Taq-Polymerase (Molzym) und 2 µL Template-DNA. Die PCR-Amplifikation wurde unter Verwendung des Thermocyclers Tpersonal (Biometra, Deutschland) mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt: Initiale Denaturierung 3 min bei 95 °C, gefolgt von 35 Zyklen mit 30 s bei 94 °C, Annealing bei 55 °C für 30 s und Extension für 30-120 s in Abhängigkeit von der Produktlänge bei 72 °C, gefolgt von einer finalen Extension für 10 min bei 72 °C. Mittels Agarosegel-Elektrophorese (1 % Tris-Acetat-EDTA Agarose Gel mit 2 µg/L Ethidiumbromid) wurde die Größe der PCR-Produkte überprüft.

Bestätigte *E. coli*-Isolate wurden auf das Vorkommen von Virulenzgenen getestet. Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die untersuchten Virulenzgene und die entsprechenden Pathotypen.

Tabelle 3.1: *E. coli*-Pathotypen und die entsprechenden Virulenzgene.

<i>E. coli</i> -Pathotyp	Virulenzgen			
	Adhesion-/ Invasion-Gen	Funktion	Toxingene	Funktion
Enterohämorrhagisch (EHEC)	eaeA*	Intimin-Protein	stx1 stx2 ehxA*	ShigaToxin I Shiga-Toxin II Enterohämolysin
Entero-toxisch (ETEC)			LT1 ST1	Hitze-labiles Toxin 1 Hitze-stabiles Toxin 1
Entero-pathogen EPEC	eaeA* bfp	Intimin-Protein Type IV Bündel-bildende Pili (<i>bundle-forming pili</i>)	cdtB	Zytolethal-distandierendes Toxin (<i>cytolethal distending toxin</i>)
Entero-aggregativ (EAEC)	aggR	Transkriptionsregulator für chromosomale Gene	east1 (astA)	EaggEC Hitze-stabiles Enterotoxin
Enteroinvasiv (EIEC)	ipaH	Invasions-Plasmid Antigen		

*Gene, die in mehr als einem *E. coli* Pathotyp auftreten

Die Isolate wurden auf elf *E. coli*-Virulenzgene unter Verwendung von zuvor veröffentlichten Primersystemen stx1 und stx2, eaeA, ehxA, LT, bfp, ST, aggR, ipaH, astA und cdtB (Sidhu et al., 2013) untersucht. Die PCR wurde unter Verwendung eines Bio-Rad iQ5-Thermocycler-System (BioRad Laboratories) und des iQ-Supremix (BioRad Laboratories) durchgeführt. Jeder PCR-Ansatz (25 µL) enthielt 12,5 µL Supremix, 120-200 nM jedes Primers und 3 µL Template-DNA. Die Temperaturbedingungen wurden der Publikation von Sidhu et al. (2013) entnommen. Bei jedem PCR-Lauf wurden entsprechende Positiv- (d. h. Ziel-DNA) und Negativkontrolle (steriles Wasser) mitgeführt. Nach jedem Lauf erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse um zwischen Produkten und Primerdimeren zu unterscheiden und die Möglichkeit falsch-positiver Ergebnisse auszuschließen. Als Positivkontrollen wurden verwendet: *E. coli* O157:H7 (ATCC 35150) für die Gene *uidA*, *eaeA*, *stx1* und *stx2*, *Shigella sonnei* (ATCC 29930) für das *ipaH*-Gen *E. coli* Serotypen O138 vom Schwein für die ST- und LT-Gene. Für die verbleibenden Virulenzgene wurde positiv-getestet DNA aus klinischen *E. coli*-Isolaten genutzt.

3.2.2 Molekularbiologische Untersuchung von Wasserproben

Für den molekularbiologischen Nachweis von DNA-Sequenzen in Wasserproben ist eine Anreicherung und ein Aufschluss der Bakterien notwendig. Aus diesem Grund lief die molekularbiologische Untersuchung von Proben auf verschiedene MST-Marker in folgenden Schritten ab: Anreicherung der Bakterien, Extraktion und Aufreinigung der DNA und abschließende PCR-basierte Messung der Genkopien.

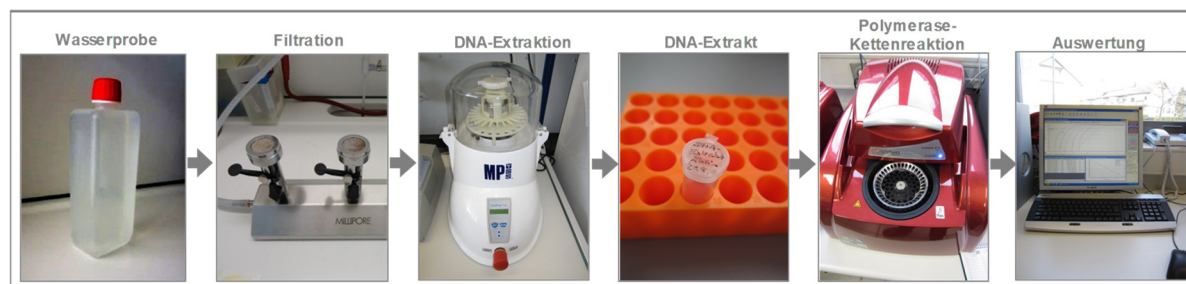


Abbildung 3.4: Schematischer Ablauf der molekularbiologischen Analytik.

3.2.2.1 Probenvorbereitung

Für Wasserproben aus den Einzugsgebieten wurden die Bakterien in einem ersten Schritt mittels Unterdruckfiltration über einen Filter mit einer Porengröße von $0,2\ \mu\text{m}$ (Supor®-200 PES, Pall) angereichert. Hierzu wurden 500-1000 mL Probe eingesetzt. Der Filter wurde anschließend bei $-20\ ^\circ\text{C}$ bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Die DNA der gefilterten und eingefrorenen Proben wurden mit dem mit einem speziell für Umweltproben konzipiertes Komplettsystem (FastDNA™ SPIN Kit for Soil der Firma MP Biomedicals) extrahiert. Für die DNA-Extraktion wurde ein halber Filter eingesetzt, die zweite Hälfte wurde als Rückstellprobe aufbewahrt. Bei der DNA-Extraktion mit dem FastDNA™ SPIN Kit for Soil wurden die Organismen durch mechanische Kräfte von der Membran gelöst, um sie in den weiteren Schritten zu lysieren und die DNA zu extrahieren. Diese wird an die Binding Matrix auf Silika-Basis gebunden und über eine Membran in Spin-Filtern aufgereinigt. Im letzten Schritt der Extraktion wird die DNA in $100\ \mu\text{L}$ DNase- und Pyrogen-freiem Wasser eluiert. In dieser Form kann die DNA bei $-20\ ^\circ\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

Die Proben der Ansätze zur Untersuchung der Stabilität wurden mittels Bacterial Xpress™ Extraction Kit (Merck Light Diagnostics) aufbereitet. Hierzu wurden 15 mL aus den Batchansätzen entnommen und 1 h bei $4000\ \text{g}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei $-20\ ^\circ\text{C}$ eingefroren. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde die DNA extrahiert. Bei der eingesetzten Extraktionsmethode wird die DNA direkt aus der Probe extrahiert, ohne dass Zelltrümmer oder andere Partikel abgetrennt werden. Das Pellet wird in einem ersten Schritt in $50\ \mu\text{L}$ destilliertem DNase und RNase freiem Wasser resuspendiert und anschließend mit $200\ \mu\text{L}$ Bacterial DNA Extraction Reagent versetzt. In weiteren Schritten wird die DNA mittels 2-Propanol und Ethanol gefällt. Zum Schluss wird die DNA mittels Vakuumzentrifugation für 10 min getrocknet und in $50\ \mu\text{L}$ DNase- und Pyrogen-freiem Wasser eluiert und bei $-20\ ^\circ\text{C}$ gelagert.

3.2.2.2 Real-time PCR-Nachweis von MST-Markern

Die im Rahmen des Projektes gewonnenen DNA-Extrakte wurden mittels qPCR auf eine Vielzahl von MST-Markern untersucht. Jede Probe wurde 1:10 verdünnt und wie die unverdünnte Probe als Duplikat in die qPCR angesetzt. Entsprechende Standards wurden in dekadischer Verdünnungsreihe von 10^7 bis 10^1 Kopien/Reaktion als Triplikate vermessen. Pro Durchlauf wurden drei Negativkontrollen, d. h. No-Template-Kontrollen, mitgeführt.

Die Vervielfältigung der Nukleinsäuren erfolgte mit dem Real-Time Cycler Rotor-Gene-6000 (Corbett Research bzw. Qiagen). Die qPCR wurden mit dem SensiMix™ SYBR No-ROX Kit mit SYBR® Green angesetzt. Alle Primersysteme wurden von der Firma Invitrogen bezogen. Die Standard-Zusammensetzung des qPCR-Mixes ist in der nachfolgenden Tabelle angegeben.

Tabelle 3.2: Zusammensetzung der qPCR-Ansätze.

Reagenz	Volumen
H ₂ O	3,2 µL
2x Sensi Mix mit SYBR Green	5 µL
Primer A (10 pmol/µL)	0,4 µL
Primer B (10 pmol/µL)	0,4 µL
Template	1 µL

Das qPCR-Programm wurde je nach untersuchtem Gen bezüglich der Annealingtemperatur und Elongationszeit angepasst. Es wurden jeweils 40-45 Zyklen durchlaufen. Die Primersequenzen, die letztendlich für die weiterführenden Untersuchungen eingesetzt wurden, sowie Informationen zu den Temperaturprogrammen der qPCR können den nachstehenden Tabellen entnommen werden.

Tabelle 3.3: Verwendete Primer für die Untersuchungen im Einzugsgebietsmaßstab.

Target	Bezeichnung	Primerpaar (5'-3')	Literaturquelle
Bacteroides-basierte Systeme			
Wirtsun-spezifisch	AllBac296f	GAGAGGAAGGTCCCCAC	Layton et al., 2006
	AllBac412r	CGCTACTTGGCTGGTTCAG	
Mensch	HF183	ATCATGAGTTCCACATGTCCG	Seurinck et al., 2005
	BacHum-241r	TACCCCGCCTACTATCTAATG	
Hund	DF 475 F	CGCTTGTATGTACCGGTACG	Bernhard und Field, 2000a; Dick et al., 2005b
	Bac708R	CAATCGGAGTTCTTCGTG	
Wiederkäuer	BacR_f	GCGTATCCAACCTTCCCG	Reischer et al., 2006
	BacR_r	CATCCCCATCCGTTACCG	
Schwein	Pig2 Bac 41 F	GCATGAATTTAGCTTGCTAAATTTGAT	Mieszkina et al., 2009
	Pig2 Bac 163 R	ACCTCATACGGTATTAATCCGC	
mtDNA-basierte Systeme			
Art-unspezifisch	Umito2-G	AAGACGAGAAGACCCTRTGGA	Kortbaoui et al., 2009
	Umito2-D2	GATTGCGCTGTTATCCCT	
Mensch	Human Cyt b forward	AGTCCCACCCTCACACGATTCTTT	Schill und Mathes, 2008
	Human Cyt b reverse	AGTAAGCCGAGGGCGTCTTTGATT	
Hund	Dog Cyt b forward	CCACAGCATTTCATGGGCTATGTACT	Schill und Mathes, 2008
	Dog Cyt b reverse	AGCTGCGATGATGAAAGGGAGGAT	
Rind	Cow Cyt b forward	AATGCATTTCATCGACCTTCCAGCC	Schill und Mathes, 2008
	Cow Cyt b reverse	ACGTCTCGGCAGATATGGGTAACA	
Huhn	Chicken Cyt b forward	TAGCCATGCACTACACAGCAGACA	Schill und Mathes, 2008
	Chicken Cyt b reverse	TTTGCGTGGAGATTCCGGATGAGT	
Pferd	Horse Cyt b forward	AGGAGCAACAGTCATCACGAACCT	Schill und Mathes, 2008
	Horse Cyt b reverse	AAATGTACGACTACCAGGGCTGTG	
Schaf	Sheep Cyt b forward	ACGCATTTCATTGATCTCCCAGCTC	Schill und Mathes, 2008
	Sheep Cyt b reverse	TCGGCAAATGTGGGTACAGAGGA	
Sonstige Systeme			
Humaner Polvovirus	HPyVsF	AGTCTTTAGGGTCTTCTACC	Arthur et al., 1989
	HPyVsR	GGTGCCAACCTATGGAACAG	

Tabelle 3.4: PCR-Programme für die verschiedenen Primersysteme. Bei jedem Lauf fand eine initiale Aktivierung der Polymerase (10 min bei 95 °C) statt.

Target	Bezeichnung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Melt
Bacteroides-basierte Systeme					
Wirtsunspezifisch	AllBac296f AllBac412r	94 °C 20 s	62 °C 20 s	72 °C 15 s	62-99 °C
Mensch	HF183F BacHum-241r	94 °C 20 s	60 °C 20 s	72 °C 35 s	60-99 °C
Mensch	DF 475 F Bac708R	94 °C 20 s	55 °C 20 s	72 °C 20 s	55-99 °C
Wiederkäuer	BacR_f BacR_r	94 °C 20 s	64 °C 20 s	72 °C 20 s	64-99 °C
Schwein	Pig2 Bac 41 F Pig2 Bac 163 R	94 °C 20 s	61 °C 20 s	72 °C 20 s	61-99 °C
mtDNA-basierte Systeme					
Art-unspezifisch	Umito2-G Umito2-D2	94 °C 20 s	65 °C 20 s	72 °C 25 s	65-99 °C
Mensch	Human Cyt b forward Human Cyt b reverse	94 °C 20 s	70 °C 20 s	72 °C 15 s	70-99 °C
Hund	Dog Cyt b forward Dog Cyt b reverse	94 °C 20 s	61 °C 20 s	72 °C 20 s	61-99 °C
Rind	Cow Cyt b forward Cow Cyt b reverse	94 °C 20 s	67 °C 20 s	72 °C 20 s	67-99 °C
Huhn	Chicken Cyt b forward Chicken Cyt b reverse	94 °C 20 s	65 °C 20 s	72 °C 15 s	65-99 °C
Pferd	Horse Cyt b forward Horse Cyt b reverse	94 °C 20 s	60 °C 20 s	72 °C 20 s	60-99 °C
Schaf	Sheep Cyt b forward Sheep Cyt b reverse	94 °C 20 s	61 °C 20 s	72 °C 20 s	61-99 °C
Sonstige Systeme					
Humaner Polyomavirus	HPyVsF HPyVsR	94 °C 20 s	59 °C 20 s	72 °C 20 s	59-99 °C

Die Auswertung der verschiedenen Läufe erfolgte mit der Software *Rotor-Gene 6000*. Mit Hilfe von DNA-Standards, die das Zielgen in bekannter Kopienzahl enthalten, wurden Standardkurven erstellt. Die dafür eingesetzten Standards wurden in Vorarbeiten am TZW hergestellt. Dazu wurden Kotproben bekannter Herkunft verwendet, um entsprechende PCR-Produkte zu gewinnen. Diese wurden in Vektoren kloniert, um eine möglichst hohe Kopienzahl der Zielgene zu erreichen. Abschließend wurden die Proben mit einem spezifischen Farbstoff für doppelsträngige DNA photometrisch vermessen und die Kopienzahlen auf 10^8 und 10^9 pro Reaktion eingestellt und bei -20 °C gelagert.

Zur relativen Quantifizierung werden die C_T -Werte (Threshold cycle) benötigt. Dieser Wert markiert den ersten Zyklus, von dem ab ein messbarer Anstieg des Fluoreszenzsignals registriert wird. Die C_T -Werte wurden mit der Rotor-Gene zugehörigen Software unter Verwendung der „Auto-Find Threshold“-Funktion berechnet. Mit dieser Funktion werden automatisch die optimalen C_T -Werte bestimmt. Hierzu wird der gesamte Bereich der möglichen Schwellenwerte gescannt, um die beste Anpassung der Standardkurve basierend auf den Proben zu erhalten, die als Standards definiert wurden (d. h. bei denen der R-Wert am nächsten bei 1,0 liegt).

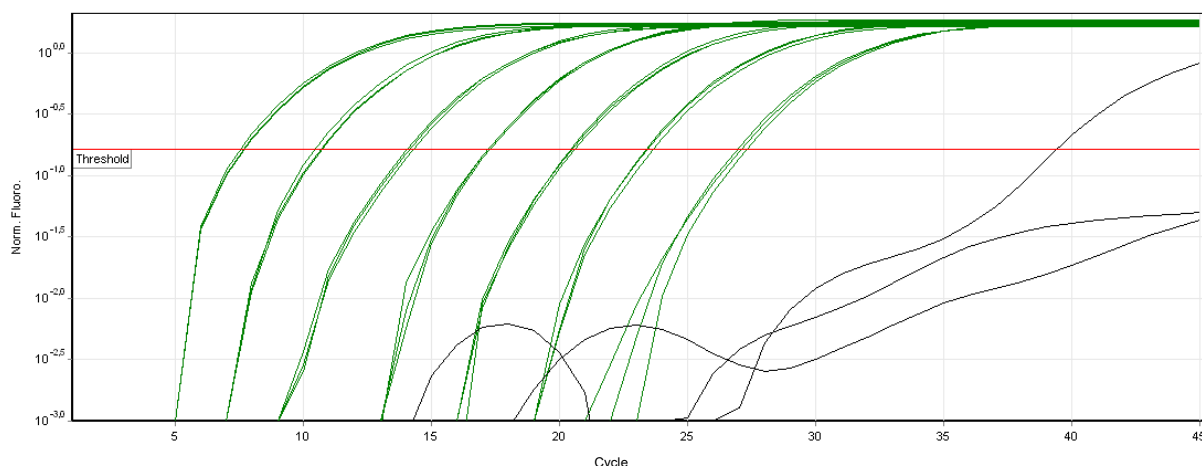


Abbildung 3.5: Fluoreszenzzunahme in den Proben mit bekannter Kopienzahl (Standards). Dargestellt sind die eingesetzten Standards (in grün) mit den Konzentrationen (von links nach rechts) 10^7 - 10^1 . In schwarz sind die No-Template Kontrollen gezeigt. In rot ist der Schwellenwert/Threshold dargestellt, den die Kurven der Standards im C_T -Wert schneiden.

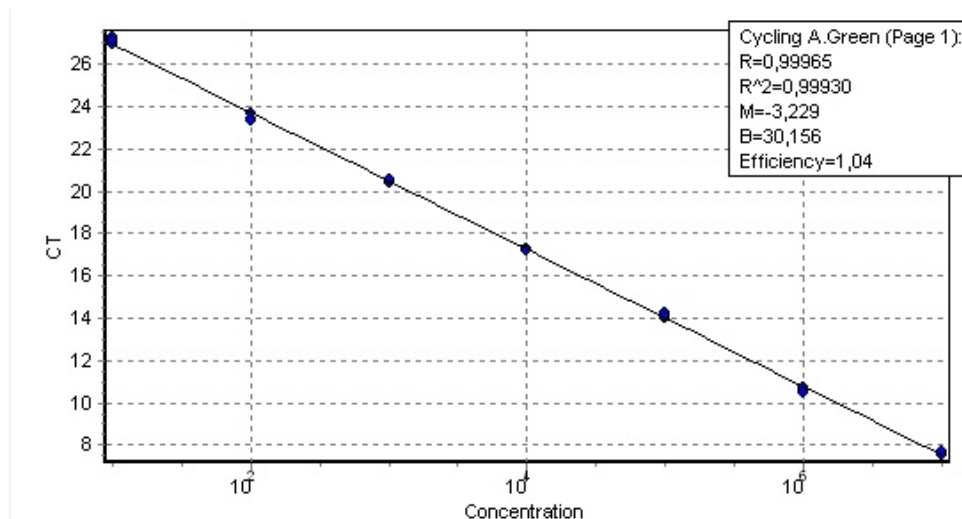


Abbildung 3.6: Beispielhafte Standardkurve eines quantitativen real-time PCR-Laufes.

Die beiden wichtigsten Maße für die Bewertung des Laufes sind die Effizienz (E) und das Bestimmtheitsmaß (R^2). Die Effizienz des Laufes sollte zwischen 0,8 und 1,1 liegen. Eine Effizienz von 1,0 bedeutet, dass in jedem Zyklus die Kopienzahl genau verdoppelt wurde. Der Wert R^2 gibt an, wieviel Prozent der Proben der Hypothese entsprechen, dass die Standards eine Standardkurve bilden. Aus diesem Grund sollte dieser Wert über 0,980 liegen. Zur Qualitätskontrolle der qPCR-Läufe wurden die Werte der Effizienz und des Bestimmtheitsmaßes erfasst. Nur Läufe, die die definierten Kriterien erfüllten ($E=0,8-1,1$ / $R^2 > 0,980$), wurden ausgewertet.

Nach jedem Lauf wurde eine Schmelzkurvenanalyse (Melt) durchgeführt. Hier wurden die amplifizierten DNA-Fragmente aufgeschmolzen, indem die Ansätze ausgehend von der Annealingtemperatur schrittweise auf 99°C erhitzt wurden. Parallel erfolgte die Erfassung der Fluoreszenz. Da die Amplifikate im Idealfall alle die gleiche Länge und die gleichen Basenpaare in gleicher Reihenfolge besitzen, sollten sie bei derselben Temperatur denaturieren. Das bedeutet, je enger die Maxima der Schmelzkurven der Standards und der unbekannten Proben im gleichen

Temperaturbereich liegen, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass die richtige Sequenz vervielfältigt wurde.

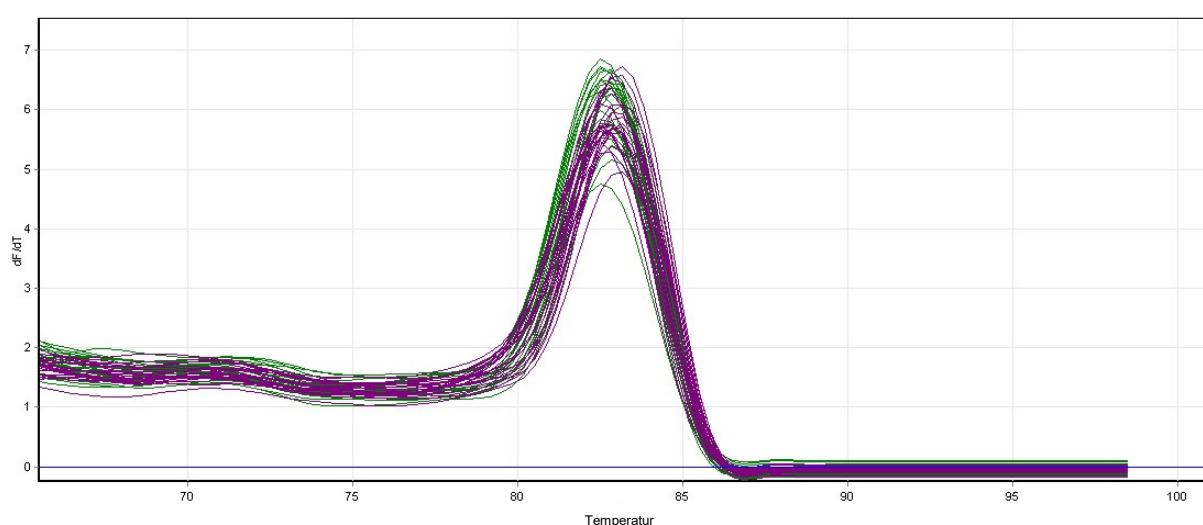


Abbildung 3.7: Beispielhafte Schmelzkurve eines quantitativen real-time PCR-Laufes.

Zusätzlich wurden die PCR-Produkte von Proben, bei denen das Ergebnis der Schmelzkurvenanalyse nicht eindeutig war, einer weiteren Qualitätskontrolle in Form einer Kapillarelektrophorese unterzogen. Dies war vor allem bei Proben der Fall, deren Kopienzahl nahe an oder unter der Bestimmungsgrenze lag (Otto et al., 2015).

Die Kapillargelelektrophorese ist eine Software-gekoppelte schnelle Methode zur Fragment-Auftrennung von Nukleinsäuren. In dünnen Kapillaren, gefüllt mit Fertiggel, werden die Fragmente anhand der Größe elektrophoretisch aufgetrennt. Verwendet wurde das Modell QIAxcel Advanced der Firma Qiagen. Die Analysen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.2.1 Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen

Der molekularbiologische Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen wurde analog zum Nachweis von MST-Markern durchgeführt. In der nachfolgenden Tabelle sind die Informationen zu den untersuchten Genen zusammengefasst.

Tabelle 3.5: Primer, Literaturquellen, Produktgrößen und Annealingtemperaturen für den Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen.

Target	Primerpaar (5'-3')	Produktgröße	Annealingtemperatur	Literaturquelle
<i>sul1</i>	F: CGCACCGGAAACATCGCTGCAC R: TGAAGTTCCGCGCAAGGCTCG	163 bp	68 °C	Pei et al., 2006
<i>bla_{TEM}</i>	F: TTCCTGTTTTGCTCACCCAG R: CTCAAGGATCTTACCGCTGTTG	112 bp	58 °C	Bibbal et al., 2007
<i>bla_{CTX-M-32}</i>	F: CGTCACGCTGTTGTTAGGAA R: CGCTCATCAGCACGATAAAG	155 bp	63 °C	Stalder et al., 2014
<i>bla_{NDM-1}</i>	F: TTGGCCTTGCTGTCCTTG R: ACACCAGTGACAATATCACCG	82 bp	67 °C	Monteiro et al., 2012
<i>mcr-1</i>	F: GGGCCTGCGTATTTTAAGCG R: CATAGGCATTGCTGTGCGTC	183 bp	55 °C	Hembach et al., 2017

3.2.2.2 Herstellung von DNA-Standards

Bei den DNA-Standards handelt es sich um Plasmide, in die ein entsprechendes PCR-Produkt kloniert wird. Diese veränderten Vektoren werden in kompetente Zellen eingebracht, und durch die Kultivierung dieser Bakterien vermehrt. Nach der Extraktion der Plasmid-DNA steht eine ausreichende Menge DNA-Material zur Verfügung. Die Plasmid-DNA wird enzymatisch linearisiert, aufgereinigt, photometrisch vermessen und die Konzentration mit Hilfe der bekannten Basenzahl in Kopien/ μL umgerechnet. Von der DNA werden Verdünnungen hergestellt, die dann als Standards in die PCR und real-time PCR eingesetzt werden können.

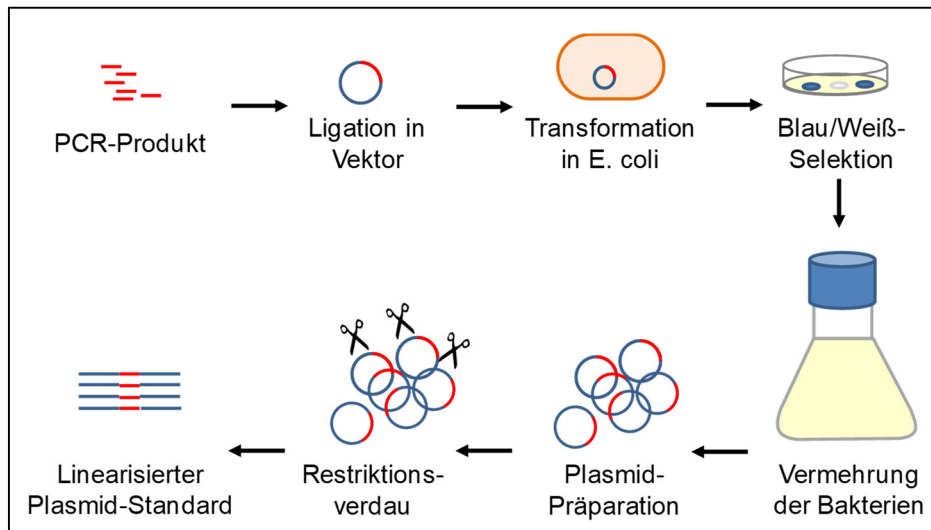


Abbildung 3.8: Workflow der Herstellung von vektoriiellen Standards.

3.2.2.3 Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese

Zusätzlich zu den PCR- und qPCR-Analysen auf MST-Marker und Antibiotikaresistenzgene wurden im Projektzeitraum auch Fingerprint-Analysen mittels DGGE durchgeführt.

Zur Durchführung der DGGE wurde das Gradienten-Gelelektrophorese-System der Firma C.B.S. Scientific verwendet. Universelle Bereiche der bakteriellen 16S rDNA wurden vor der DGGE mittels PCR amplifiziert. Hierfür wurden zum einen unspezifische bakterielle Primer nach Muyzer und Smalla (1998; 534 R und 341 F) und zum anderen *Bacteroides*-spezifische Primer (Liu et al., 2003; Bfr-F und Bfr-R mit GC-Klammer am 5' Ende) eingesetzt.

Die PCR-Produkte wurden in einem 7,5 % (w/v) Polyacrylamid-Gel mit einem DNA-denaturierenden Gradient von 30-70 % separiert. Die DNA-Banden wurden mittels SYBR® Gold (Life Technologies) angefärbt und dokumentiert.

Die Ähnlichkeitsanalyse der Bandenmuster der DGGE-Gele erfolgte mit der Python-basierten Software PyElph 1.4 (Pavel und Vasile, 2012). Die Software ermöglicht die automatische Detektion der einzelnen Banden in jeder Gelspur. Hierzu wurden folgende Parameter eingestellt: Threshold 15, Filter width 1 und Filter passes 5. Im Anschluss wurden die Bandenmuster durch „Matching“ verglichen und eine Distanzmatrix erstellt, die dann als Dendrogramm grafisch dargestellt wurde.

3.3 Untersuchungen zur Erfassung der Charakteristika der Kultur-unabhängigen Microbial Source Tracking-Verfahren

3.3.1 Nachweisempfindlichkeit

Um die Praxistauglichkeit der MST-Methoden besser abschätzen zu können wurden Untersuchungen zur Nachweisempfindlichkeit durchgeführt. In diesem Zusammenhang sollte geklärt werden, bei welchen Mischungs-, d. h. Verdünnungsverhältnissen, ein Nachweis möglich ist.

Modellhaft wurden Kläranlagenzulauf und Hundekot als mögliche Kontaminationsquellen ausgewählt. Es wurde eine dekadische Verdünnungsreihe vom Zulauf der Kläranlage Karlsruhe-Neureut mit Leitungswasser hergestellt. Analog wurden 0,15 g Hundekot (Nassgewicht, Mischproben von mehreren Individuen) als Kontamination in 15 mL Leitungswasser gegeben. Nach gründlicher Durchmischung wurde ebenfalls eine dekadische Verdünnungsreihe erstellt. Von jeder Verdünnung wurden 10 mL für die molekularbiologische Analyse aufbereitet. Das bedeutet, die Proben wurden über Membranfiltration aufkonzentriert und mit Hilfe des FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals) wurde die Gesamt-DNA gewonnen. Anschließend wurde eine qPCR-Analyse der Proben auf wirtsunspezifische und human- bzw. Hunde-spezifische *Bacteroides*- und mtDNA Sequenzen durchgeführt.

3.3.2 Spezifität und Sensitivität

Die entwickelten molekularbiologischen Werkzeuge zur Identifizierung von fäkalen Kontaminationsquellen wurden hinsichtlich ihrer Spezifität geprüft. Hierzu wurden Analysen von Kotproben durchgeführt. Auf diese Weise konnten Kreuzreaktionen erkannt und die Nachweisverfahren sukzessive optimiert werden.

Hierzu wurden 48 Fäkalproben mit den unterschiedlichen Primersystemen untersucht. In der nachfolgenden Tabelle wird ein Überblick über die eingesetzten Proben gegeben:

Tabelle 3.6: Eingesetzte Kotproben zur Untersuchung der Spezifität.

Herkunft	Probenart	Anzahl der Proben
Mensch	Zulauf städtische Kläranlage	7
Schwein	Mischprobe von mind. 10 Individuen	7
Rind	Mischprobe von mind. 10 Individuen	7
Huhn	Mischprobe von mind. 10 Individuen	7
Pferd	Mischprobe von mind. 10 Individuen	6
Katze	Mischprobe von mind. 10 Individuen	2
Hund	Mischprobe von mind. 10 Individuen	1
Vogel	Mischprobe von mind. 10 Individuen	1
Gans	Mischprobe von mind. 10 Individuen	2
Ente	Mischprobe von mind. 10 Individuen	1
Hase	Mischprobe von mind. 10 Individuen (Stall)	1
Hase	Mischprobe von 2 Individuen (wildlebend)	1
Schaf	Mischprobe von 3 Individuen	1
Fuchs, Dachs, Marder	Mischprobe von 11 Individuen	1
Reh	Mischprobe von 11 Individuen	1
Damwild	Mischprobe von 3 Individuen	1
Wildschwein	Mischprobe von 5 Individuen	1
Summe		48

Die qPCR-Daten wurden hinsichtlich des Vorhandenseins eines Signales (positiv/negativ) ausgewertet und die Spezifität bzw. Sensitivität errechnet (siehe Kapitel 5.2.2).

3.3.3 Charakterisierung möglicher Eintragsquellen

Zur Charakterisierung von möglichen Eintragsquellen wurde die Analyse von im Labor hergestellten Abwässern sowie Proben aus dem Zulauf einer städtischen Kläranlage durchgeführt. Es wurde geprüft, ob MST-Marker saisonalen Schwankungen unterworfen sind. Insgesamt wurden 5 Proben aus dem Zulauf einer städtischen Kläranlage und 18 im Labor hergestellte Abwässer (4x Schwein, 4x Rind, 5x Huhn, 5x Pferd) in die Untersuchungen einbezogen. Zur Herstellung der Modellabwässer wurden frische Kotproben von mindestens zehn Individuen gesammelt und mit Leitungswasser vermischt. Zur Gewinnung der Kotproben wurden Probennahmekampagnen zu verschiedenen Jahreszeiten durchgeführt. An den gleichen Terminen wurde der Zulauf der Kläranlage Karlsruhe-Neureut beprobt. Die Proben wurden auf folgende Parameter untersucht:

- *E. coli*
- intestinale Enterokokken
- *C. perfringens* Sporen
- Wirtsunspezifischer *Bacteroides*-Marker
- Art-unspezifischer mtDNA-Marker

Die nachgewiesenen Marker- bzw. Bakterienkonzentrationen und ihre Verhältnisse zueinander wurden mit den Befunden anderer Proben abgeglichen.

3.3.4 Untersuchungen zur Stabilität von Microbial Source Tracking-Markern

Ein wichtiger Punkt bei der Interpretation der Daten zum Auftreten von ausgewählten MST-Markern in den Untersuchungsgebieten ist deren Stabilität. Um die Stabilität von vier verschiedenen MST-Markern zu untersuchen, wurden unterschiedliche Batch-Ansätze durchgeführt. Als Rahmenbedingungen wurden 10 °C oder 20 °C (bzw. Raumtemperatur) und aerobe bzw. anaerobe Bedingungen festgelegt. Alle vier Kombinationsmöglichkeiten wurden als Triplikate angesetzt.

Als Kontaminant wurde Abwasser aus dem Zulauf der Kläranlage Karlsruhe-Neureut eingesetzt, welches eine fäkale Verunreinigung durch den Menschen darstellen soll. Das Abwasser wurde in einem großen Ansatz 1:10 mit Leitungswasser verdünnt und je zwei Liter wurden in die entsprechenden Batchflaschen abgefüllt. Alle zwölf Flaschen wurden unter Ausschluss von Tageslicht inkubiert.

Die aeroben Ansätze wurden über Aquarienpumpen und Waschflaschenaufsätze begast, um eine dauerhafte Belüftung mit Luft (Sauerstoff) zu gewährleisten. Sowohl die Zu-, als auch die Abluft wurden über Sterilfilter geleitet. Die anaeroben Versuche wurden in einer Stickstoff-beaufschlagten Anaerob-Box angesetzt.



Abbildung 3.9: Batchexperimente zur Stabilität von Microbial Source Tracking-Markern.

Über eine Versuchsdauer von 36 Tagen wurde zu zehn verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen. Die Probennahme erfolgte an Tag 0 (Start-Beprobung) und an den Tagen 1, 2, 4, 8, 10, 14, 16, 22, 29 und 36. Bei jeder Probennahme wurden ca. 50 mL aus den Flaschen in sterile Zentrifugenröhrchen überführt. Davon wurden direkt 10 mL zur Messung der Sofortparameter pH-Wert, Temperatur und Sauerstoffgehalt eingesetzt. Die Beprobung der anaeroben Ansätze erfolgte in der Anaerob-Box, in der auch die Messung der Sofortparameter erfolgte. Zusätzlich wurden Proben für die Analyse von *E. coli*, intestinalen Enterokokken und *C. perfringens* sowie für die PCR-Analytik der MST-Marker entnommen.

Um das Verhalten der Marker untereinander und mit dem der Indikatorbakterien besser darstellen und vergleichen zu können, wurden die Abbauraten bestimmt. Dies geschah in Anlehnung an Liang et al. (2017) und unter der Annahme eines exponentiellen Abbaus erster Ordnung.

$$\ln\left(\frac{C_t}{C_0}\right) = -kt$$

Formel 3.1: **Formel zur Berechnung der Abbauraten**

wobei k = Abbaurate,
 C_t = Kopien oder KBE/100 mL zum Zeitpunkt t ,
 C_0 = Kopien oder KBE/100 mL zum Zeitpunkt 0 und
 t = Zeit (in Tagen) darstellen.

Für jeden mikrobiologischen und molekularbiologischen Parameter wurde die ermittelte Konzentration zu jedem Probenahmezeitpunkt normalisiert, in dem der natürliche Logarithmus (\ln) aus dem Verhältnis der Konzentration zu einem Zeitpunkt t (C_t) zu der Ausgangskonzentration (C_0) berechnet wurde. Anschließend wurden die normalisierten Werte in Excel über die Zeit aufgetragen und die Abbauraten anhand der Steigung der eingefügten Trendlinien ermittelt. Für die Berechnungen wurden nur die Werte der ersten 14 Tage genutzt, Werte kleiner Limit of Quantification (LQ; PCR) oder Nachweisgrenze (Kulturverfahren) wurden nicht berücksichtigt. Zusätzlich wurde die Regressionskoeffizienten (r^2) und die Zeit (T_{90}), in der die Konzentration um 90% (entspricht einer Log-Stufe) reduziert wird, ermittelt.

$$T_{90} = -\frac{\ln(0,1)}{k}$$

Formel 3.2: **Formel zur Berechnung von T_{90}**

wobei k die Abbaurate ist.

3.4 Statistische Auswertung

Die gesammelten Daten für das Einzugsgebiet der Gallusquelle wurden mit Microsoft Excel 2016 weiterverarbeitet und statistisch aufbereitet. Um Korrelationen zwischen Trübung, der Anzahl an fäkalen Indikatorbakterien und den Genkopienzahlen der MST-Marker zu bewerten, wurde eine Analyse des Korrelationskoeffizienten (r) nach Pearson mit dem Datenanalyse-Tool der Excel-Software durchgeführt.

In Hinblick auf die Daten zum Vorkommen von MST-Markern und Antibiotikaresistenzgenen wurde eine Ein-Faktor-Varianzanalyse (ANOVA; $P= 0,05$) zur Erfassung von statistisch signifikanten Unterschieden in der geographischen und zeitlichen Verteilung angewandt.

4. BESCHREIBUNG DER UNTERSUCHUNGSGEBIETE

Insgesamt wurden sieben Untersuchungsgebiete mittels MST-Verfahren untersucht:

- Rhein
- Gallusquelle
- Wasserwerk Tiefwerder
- Wasserwerk Kaulsdorf
- Talsperre Herbringhamen
- Talsperre Kerspe
- Tai See in China

Diese Untersuchungsgebiete unterschieden sich deutlich hinsichtlich ihrer Größe und Komplexität, aber auch ihrer möglichen Eintragsquellen fäkaler Kontaminationen:

4.1 Rhein

Der Rhein ist der längste Fluss Deutschlands. Von seiner Quelle am Schweizer Tomasee bis zu seiner Mündung in die Nordsee legt er mehr als 1.233 Kilometer zurück, davon 865 allein durch Deutschland. Da der Fluss als Trinkwasserressource für viele Städte wichtig ist, ist die Wasserqualität des Rheins zu prüfen, um so Belastungen zu vermeiden und zu erkennen. Das Rohwasser für die Trinkwasseraufbereitung stammt zumeist aus Uferfiltrat oder sogenannten Schluck- und Förderbrunnen. Dies ist auch am Wasserwerk Flehe (Düsseldorf) der Fall. Die Brunnen dieses Wasserwerkes fördern ein Rohwasser, das zu rund einem Viertel aus Grundwasser und rund drei Vierteln aus versickertem Rheinwasser besteht und anschließend umfangreich aufbereitet wird.

Aus dem Rhein bei Düsseldorf-Flehe wurden Schöpfproben genommen und auf coliforme Bakterien und *E. coli* untersucht. Die gewonnenen Isolate wurden zwecks Identifizierung fäkaler Einträge auf verschiedene Virulenzgene untersucht.

4.2 Gallusquelle

Die Gallusquelle ist eine der größten Quellen der Schwäbischen Alb und umfasst ein Einzugsgebiet von etwa 45 km². Mit einer Schüttung von 0,5 m³/s (Jahresmittel) sichert sie die Wasserversorgung von rund 40.000 Menschen. Daher werden der Wasserstand, die elektrische Leitfähigkeit und die Trübung mit einer Multiparametersonde (MSM-9, UiT GmbH) direkt an der Quelle erfasst. Grundwasserneubildung im Einzugsgebiet der Gallusquelle entsteht durch perkolierendes Regenwasser. Die Quelle wurde innerhalb der letzten 25 Jahre intensiv hydrogeologisch untersucht (Geyer et al., 2008; Hillebrand et al., 2012; Sauter, 1992; Schiperski et al., 2015a; Schiperski et al., 2015b; Zirlewagen et al., 2016). Tracerversuche zeigen eine lineare Beziehung zwischen Quellschüttung und der durchschnittlichen Fließgeschwindigkeit, was auf phreatische Bedingungen hinweist (Hillebrand et al., 2012; Hillebrand et al., 2014; Sauter, 1992).

Topographisch lässt sich das Einzugsgebiet als geneigtes Plateau mit einer Höhe von 600-900 m ü. NN beschreiben. Charakteristisch für die Landschaft des Einzugsgebietes der Gallusquelle sind Trockentäler. Sie werden als ehemals aktive Wasserläufe gedeutet. Strayle (1970) konnte zeigen, dass der Verlauf der Trockentäler größtenteils durch den Verlauf der vorherrschenden Störungszonen beeinflusst ist. Zwei große Grabensysteme wurden kartiert: Zum einen der herzynisch streichende Hohenzollerngraben (100-140°), sowie der rheinisch streichende Lauchertgraben (0-30°). Innerhalb des Einzugsgebietes gibt es keine Flüsse.

Aufgrund starker lokaler Heterogenitäten im hydraulischen Parameterfeld von Karstsystemen kann der Prozess der Grundwasserneubildung sehr schnell und konzentriert stattfinden (Geyer et al., 2008). Verunreinigungen können so beinahe ungehindert mit perkolierendem Regenwasser in den Grundwasserleiter gelangen. Ryan und Meiman (Ryan und Meiman, 1996) untersuchten eine Karstquelle in den USA und stellten dabei die hohe Variabilität des Quellabflusses fest. Insbesondere in Folge von Regenereignissen unterliegen Karstquellen starken quantitativen und qualitativen Schwankungen.

Die Landnutzung im Einzugsgebiet ist wie folgt: Etwa 3 % der Fläche sind Wohngebiete, 55 % sind Waldflächen. 27 % der Oberfläche werden von Grasflächen und 15 % von Ackerflächen bedeckt (Sauter, 1992). Die Ackerflächen werden meist mit Getreide (Sommer-, Wintergerste, Hafer und Weizen) bewirtschaftet. Außerdem wird Raps angebaut, in geringen Mengen auch Mais und als Zwischenfrucht Senf.

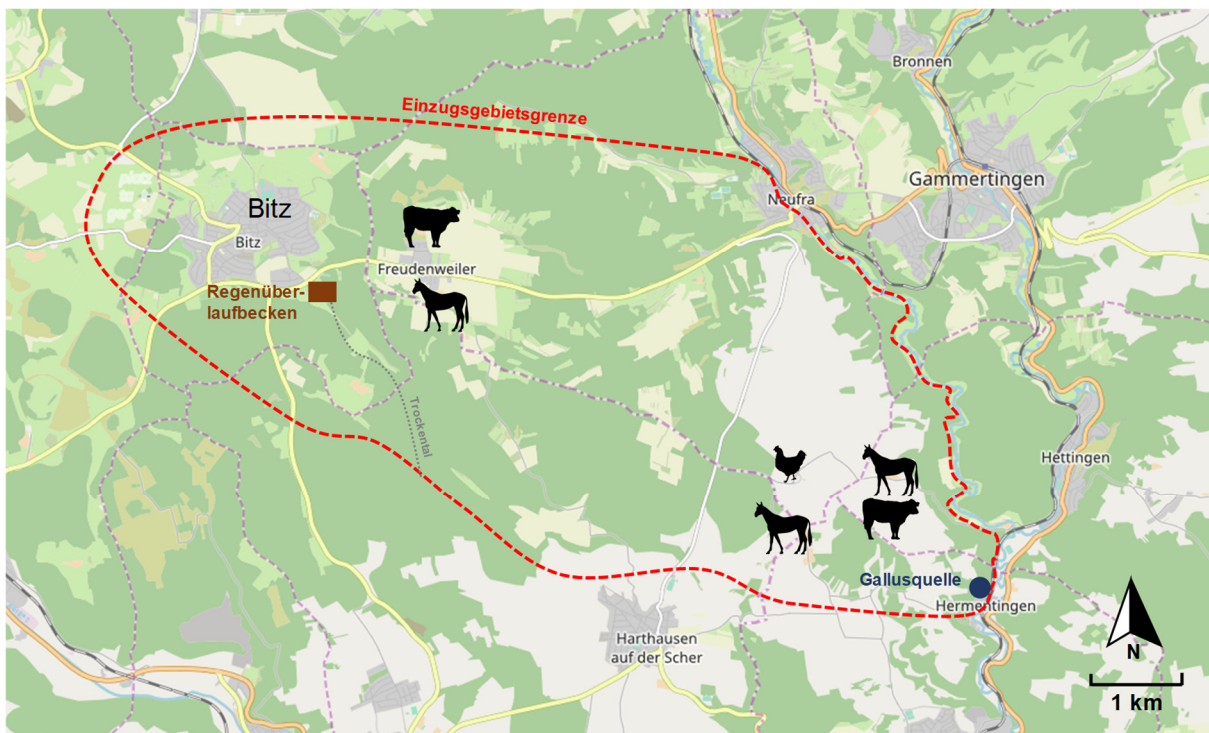


Abbildung 4.1: Einzugsgebiet der Gallusquelle (angelehnt an (Auckenthaler und Huggenberger, 2003; Birk et al., 2005) mit den möglichen fäkalen Eintragsquellen. (Diese Karte wurde mit Daten von Open Street Map (www.openstreetmap.org) erstellt.)

Die großen Grasflächen werden zur Haltung von Milchvieh genutzt, außerdem werden Schweine- und Schafzucht betrieben. Eine besondere Stellung kommt der Geflügelhaltung zu. Im Einzugsgebiet befindet sich eine große Anlage für Legehennen mit über 40.000 Tieren. Außerdem sind

einige größere Pferdehöfe im Einzugsgebiet lokalisiert. In den Wäldern sind vor allem Damhirsche anzutreffen.

Die Gesamteinwohnerzahl im Einzugsgebiet der Gallusquelle beträgt etwa 4.000 (Zirlewagen et al., 2016). Das anfallende Abwasser sowie Regenwasser werden über eine Mischkanalisation in Klärwerke in Harthausen und Neufra geleitet (Hillebrand et al., 2012). Für starke Regenereignisse existieren mehrere Regenüberlaufbecken.

Frühere Studien haben die primären Kontaminationsquellen der Gallusquelle auf der Grundlage der Analyse von organischen Mikroverunreinigungen und *E. coli* identifiziert (Heinz et al., 2006; Heinz et al., 2009; Hillebrand et al., 2012; Hillebrand et al., 2014; Schiperski et al., 2015a; Schiperski et al., 2015b; Zirlewagen et al., 2016). Zu den potenziellen Kontaminationsquellen gehören ein Regenüberlaufbecken, das sporadisch in ein Trockental entlastet (Heinz et al., 2006; Heinz et al., 2009), das Mischwassersystem der Gemeinden im Einzugsgebiet (Hillebrand et al., 2012), landwirtschaftliche Aktivitäten, die zu einem Eintrag von Herbizide führen (Hillebrand et al., 2014), und Abfluss (Run-off) von Siedlungsflächen (Schiperski et al., 2015b).

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Heinz et al. (2009) zeigen, dass die Zahl der *E. coli*-Bakterien 2-5 Tage nach dem Überlauf des Regenrückhaltebeckens im Karstgrundwasser um bis zu vier Zehnerpotenzen ansteigt. Es ist davon auszugehen, dass neben *E. coli* auch andere Bakterien in das Grundwasser eingetragen werden. Im Mischsystem wird das in Haushalten, Gewerbe und Industrie anfallende Abwasser (Schmutzwasser) zusammen mit dem Niederschlagswasser und dem unvermeidlichen Fremdwasser in einem Kanal gesammelt und abgeleitet. Bei Regen treten sehr hohe Abflüsse auf, die nicht vollständig in Kläranlagen behandelt werden können. Daher werden Regenüberlaufbecken eingebaut, die einen Teil dieser Abflüsse zwischenspeichern oder überlaufen lassen können. Das Regenüberlaufbecken im Einzugsgebiet der Gallusquelle ist in einem Trockental lokalisiert. Trockentäler werden im Allgemeinen als frühere Verläufe von Oberflächengewässern interpretiert, die im Zuge der Verkarstung trockengefallen sind. Entlang der Trockentäler erfolgt die Grundwasserneubildung in konzentrierter Form.

Vor diesem Hintergrund sollte eine auf experimentellen Daten basierende Identifizierung der Kontaminationsquellen durchgeführt werden. Ziel der Untersuchungen war es, zu klären, ob die im Einzugsgebiet betriebene Tierhaltung (Huhn, Pferd, Rind) oder Einträge durch häusliches Abwasser über Leckagen im Kanalsystem sowie das Überlaufen eines Regenüberlaufbeckens Auswirkungen auf die Rohwasserqualität haben.

Von Februar 2012 bis August 2013 wurden wöchentlich Proben aus der Gallusquelle entnommen. Im Juli 2012, Oktober 2012, Mai 2013 und Juli 2013 wurden vor Ort Kampagnen durchgeführt, im Rahmen derer die Probennahmefrequenz deutlich erhöht wurde. Alle Proben wurden auf die Indikatorbakterien *E. coli* und Enterokokken analysiert. Zusätzlich wurden die Proben für die molekularbiologische Analytik aufbereitet.

4.3 Einzugsgebiete der Berliner Wasserbetriebe

Die Berliner Wasserbetriebe versorgen 3,5 Millionen Einwohner mit Trinkwasser. Insgesamt sichern neun verschiedene Wasserwerke die Trinkwasserversorgung. Im Vorfeld der Untersuchungen wurden die einzelnen Einzugsgebiete hinsichtlich ihrer Eignung für das Projekt bewertet. Es wurden die beiden städtisch geprägten Untersuchungsgebiete Kaulsdorf und Tiefwerder für die Untersuchungen auf die Eintragsquellen fäkalen Kontaminationen ausgewählt.

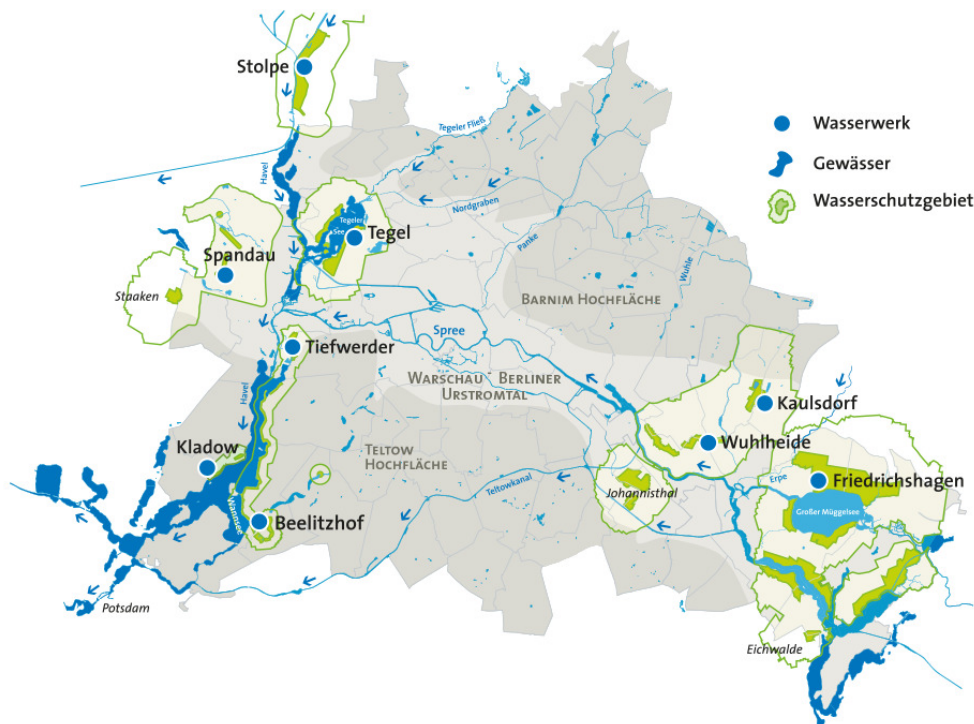


Abbildung 4.2: Übersicht über die Wasserwerke der Berliner Wasserbetriebe (Quelle: <http://www.bwb.de/content/language1/html/941.php>).

4.3.1 Wasserwerk Tiefwerder

Das Untersuchungsgebiet des Wasserwerkes Tiefwerder umfasst die Brunnen der Galerien Rupenhorn und Schildhorn. Das Einzugsgebiet der Brunnen der Galerien Rupenhorn und Schildhorn ist durch den in der Havel nachweisbaren Einfluss des Ablaufs des Klärwerks Ruhleben und der Mischkanal- und Regenwasserüberläufe der Spree und deren Zuflüsse geprägt. Das Klärwerk Ruhleben entwässert in die Untere Havel bzw. den Wannensee. Darüber hinaus besteht eine latente Gefahr durch die nicht schutzzonengerecht ausgebaute Havelchaussee und Angerburger Allee. Die Straßen verfügen über keine Entwässerungsanlagen. Das anfallende Regenwasser wird direkt in Richtung Wasserwerk abgeleitet. Es wird teilweise in Senken versickert oder in den Hohlen Weg eingeleitet. Hinzu kommt im Sommer eine direkte potenzielle Gefährdung der Galerien Rupenhorn und Schildhorn durch Bade- und Erholungsgäste, da dort keine öffentlichen Sanitäranlagen vorhanden sind.

Die Probennahmestellen wurden durch die Berliner Wasserbetriebe festgelegt. Es wurden Proben aus folgenden Messstellen in die Untersuchungen einbezogen:

- Galerie Schildhorn Brunnen 2
- Galerie Schildhorn Brunnen 4
- Schöpfprobe Unterhavel, Schildhorn

Die Probennahmekampagnen wurden durch die BWB durchgeführt. Über einen Zeitraum von ca. sechs Monaten wurden wöchentlich Grund- und Oberflächenwasserproben für die Untersuchungen auf MST-Marker genommen und über Nacht nach Karlsruhe versendet.

Zusätzlich wurden die Einflüsse auf das Rohwasser des Wasserwerks Tiefwerder noch großräumiger betrachtet, d. h. es wurden Proben aus dem Zustrom der Unterhavel und aus dem Abstrom bis hin zur Spree untersucht. Die verschiedenen Messstellen können der nachfolgenden Abbildung entnommen werden.

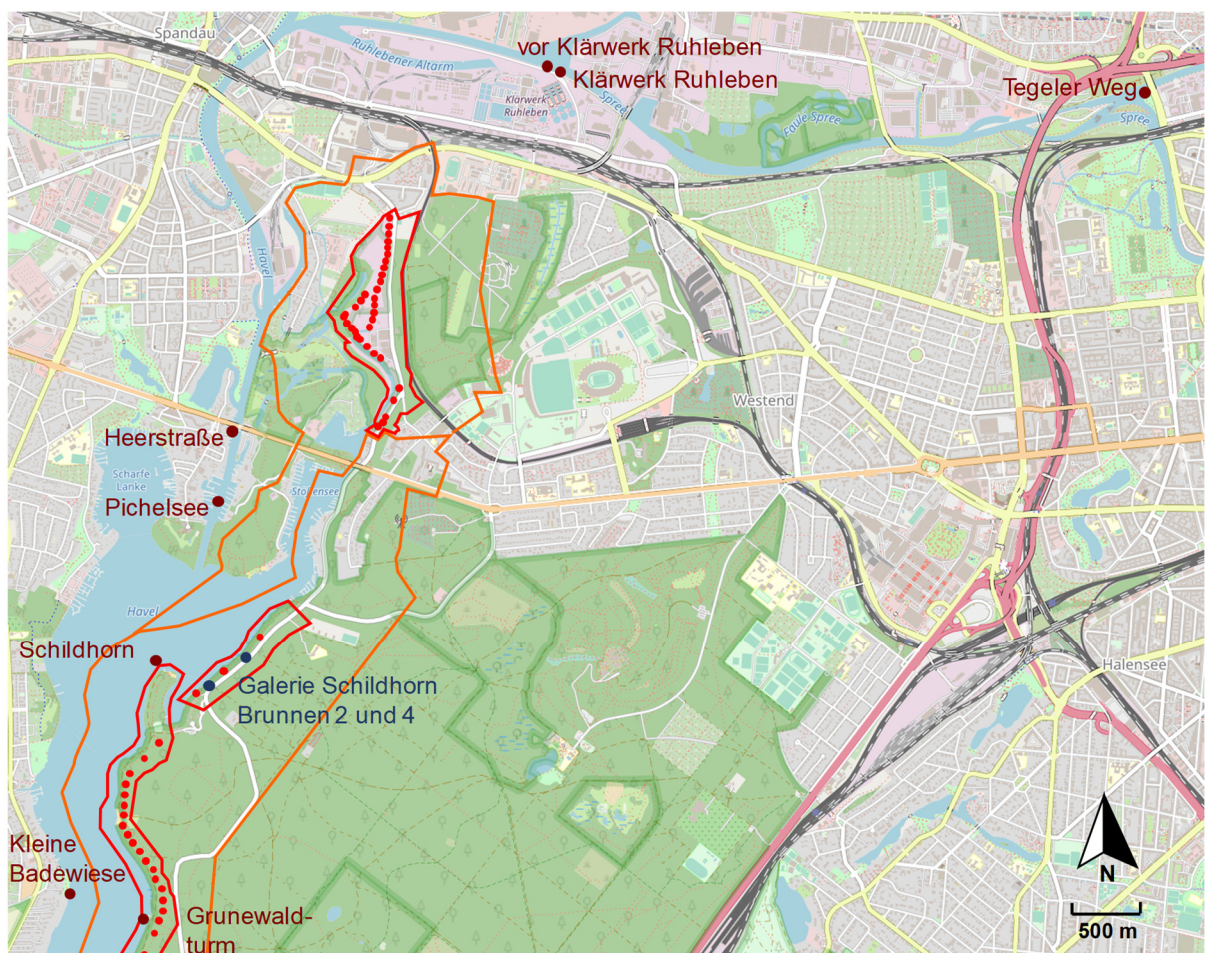


Abbildung 4.3: Einzugsgebiet des Wasserwerks Tiefwerder mit den Brunnergalerien und den Wasserschutzzonen 1 (rot) und 2 (orange). Die beprobten Oberflächenwassermessstellen im Zu- und Abstrom von Schildhorn sind in braun markiert und die Grundwasserpegel in blau. (Diese Karte wurde mit Daten von Open Street Map (www.openstreetmap.org) erstellt.)

4.3.2 Wasserwerk Kaulsdorf

Das Untersuchungsgebiet Kaulsdorf befindet sich im Osten des Stadtgebietes von Berlin. Das Wasserwerk Kaulsdorf kann als reines Grundwasserwerk bezeichnet werden. Zur Rohwassergewinnung werden Brunnengalerien (Nord und Süd) genutzt. Diese Brunnengalerien werden zwar durch Einzäunungen geschützt, trotzdem ist das Auftreten von Rot- und Schwarzwild innerhalb dieser Einzäunung zu beobachten. Belastungen können von den umliegenden Siedlungsgebieten, die zu kleinen Teilen noch nicht an die öffentliche Kanalisation angeschlossen sind, und von den nicht schutzzonengerecht ausgebauten Straßen ausgehen. Eine potenzielle Gefährdung der Galerien Nord und Süd besteht in den Sommermonaten durch Erholungssuchende und Badende rund um den Habermannsee. Sanitäre Einrichtungen sind nicht vorhanden. Autos werden auf unbefestigtem Boden ohne Sicherungsmaßnahmen geparkt. Des Weiteren wird das Gebiet um die beiden Seen als Hundeauslaufgebiet genutzt.

Der Untergrund der Fassungen des Wasserwerkes Kaulsdorf wird von quartären Sedimenten aufgebaut. Die generelle Grundwasserbewegung im Hauptgrundwasserleiter ist von der Hochfläche des Barnim zum Berliner Urstromtal gerichtet. Im Urstromtal wird das Fließverhalten des Grundwassers durch die tiefen Absenktichter der Brunnen bestimmt. Zufluss von Uferfiltraten aus der Wuhle oder gar der Spree sind unbedeutend.

Die Probennahmestellen wurden durch die Berliner Wasserbetriebe festgelegt. Es wurden Proben aus folgenden Messstellen in die Untersuchungen einbezogen:

- Galerie Süd Brunnen 8
- Galerie Nord Brunnen 2
- Schöpfprobe Habermannsee

Die Probennahmekampagnen im urbanen Einzugsgebiet Kaulsdorf wurden analog zu den Kampagnen im Einzugsgebiet Tiefwerder durchgeführt.



Abbildung 4.4: Lage der Brunnengalerien mit Schutzzonen 1 (rot) und 2 (gelb) des Wasserwerks Kaulsdorf. Die beprobten Pegel sind blau markiert. (Diese Karte wurde mit Daten von Open Street Map (www.openstreetmap.org) erstellt.)

4.4 Einzugsgebiete der WSW Energie & Wasser AG

Die WSW Energie & Wasser AG betreibt drei Wasserwerke. Eines davon ist das Wasserwerk Herbringhausen, das sein Rohwasser aus der Herbringhauser und der Kerspe-Talsperre bezieht.

4.4.1 Talsperre Herbringhausen

Das Einzugsgebiet der Talsperre Herbringhausen ist durch Waldgebiete und daran angrenzende Ackerflächen geprägt. Insgesamt hat das Einzugsgebiet eine Größe von ca. 5,8 km² und

repräsentiert damit ein kleines, übersichtliches Gebiet (siehe Abbildung 4.5). Verunreinigungen aus Fäkaleinträgen wurden in der Vergangenheit wiederholt nachgewiesen. Gezielte Untersuchungen auf MST-Marker waren an mehreren Zuläufen von Oberflächenwasser möglich.

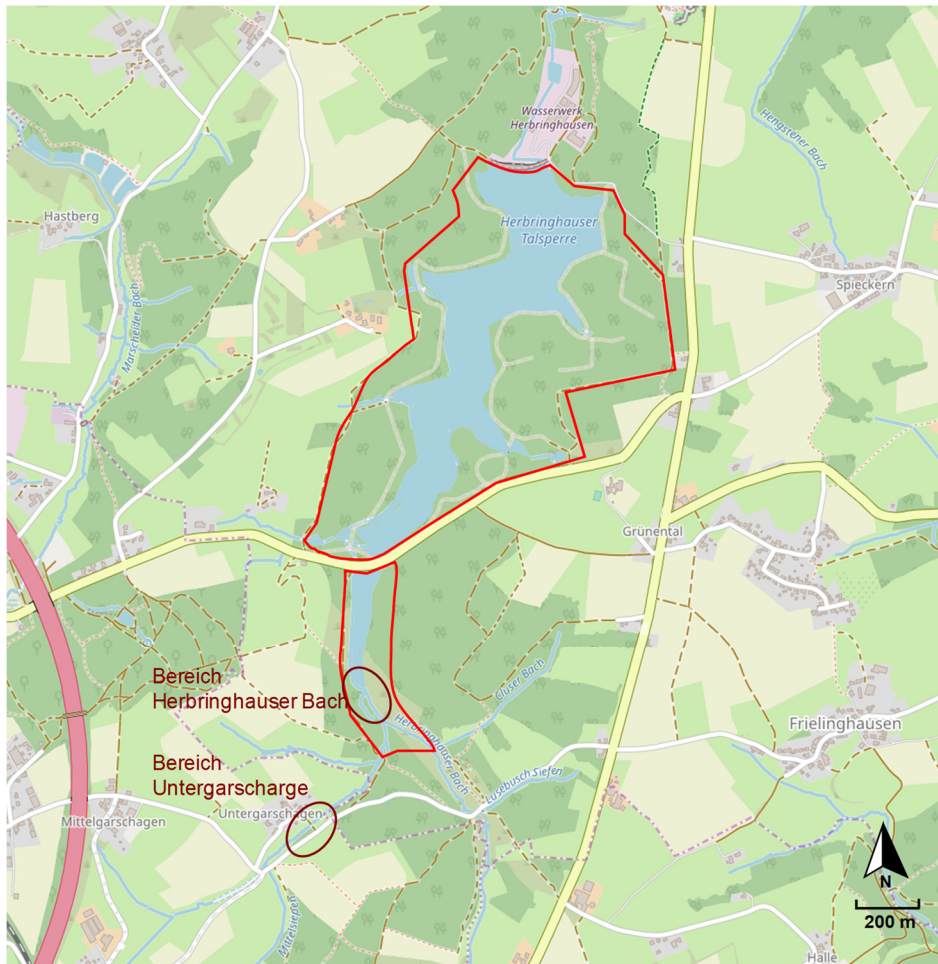


Abbildung 4.5: Herbringhauser Trinksperretalsperre mit den beprobten Bereichen (braun) und der Wasserschutzzone 1 (rot). (Diese Karte wurde mit Daten von Open Street Map (www.openstreetmap.org) erstellt.)

Die Proben der Talsperre Herbringhausen wurden während zwei Probennahmekampagnen gewonnen. Insgesamt wurden aus vier verschiedenen Stellen aus dem Zulauf der Talsperre Schöpfproben entnommen.

4.4.2 Talsperre Kerspe

Dieses Einzugsgebiet besteht zum Großteil aus Waldgebieten und Acker- und Grünlandwirtschaftsflächen. In der Vergangenheit wurden bereits mehrfach fäkale Verunreinigungen nachgewiesen. Proben konnten an verschiedenen Zuläufen der Stauseen genommen werden. Aufgrund der gut gesicherten Wasserschutzgebiete, wird davon ausgegangen, dass vor allem Wildtiere einen Einfluss auf die biologische Wasserqualität haben könnten.

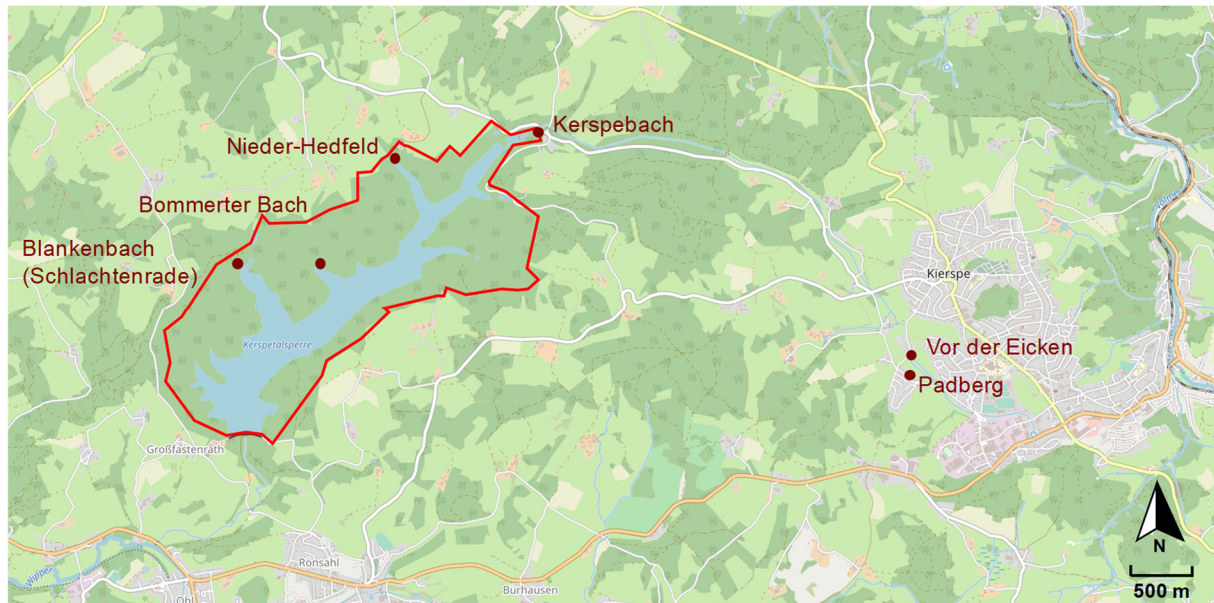


Abbildung 4.6: Einzugsgebiet Talsperre Kerspe mit den beprobten Messstellen (braun) und der Wasserschutzzone 1 (rot). (Die Karte wurde mit Daten von Open Street Map (www.openstreetmap.org) erstellt).

Während zwei Probennahmekampagnen wurden jeweils sechs Schöpfproben aus den Zuflüssen der Kerspe-Talsperre (KB05 Kerspebach (Brücke Mühlen-Schmith.), KB31 Vor den Eicken (Nikolay), KB01 Blankenbach (Schlachtenrade), KB02 Bommerter Bach, KB27 Padberg, KB03 Nieder-Hedfeld) genommen.

4.5 Tai-See

Der Tai-See liegt im Jangtse-Delta im Osten Chinas, einem der am dichtesten bevölkerten Gebiete der Welt. Ungefähr 40 Millionen Menschen leben in Städten (einschließlich Shanghai) und Gemeinden innerhalb des Wassereinzugsgebietes des Sees. Der Tai-See ist mit einer Fläche von 2.338 km² und einem Einzugsgebiet von 36.500 km² der drittgrößte Süßwassersee Chinas und dient als Trinkwasserquelle für rund zehn Millionen Menschen. Aufgrund der großen Ausdehnung des Sees wurde das Untersuchungsgebiet auf die nördliche Region begrenzt, die die Zhushan Bay, die Meiliang Bay und die Gonghu Bay sowie den inneren Tai-See umfasst (siehe Abbildung 4.7).

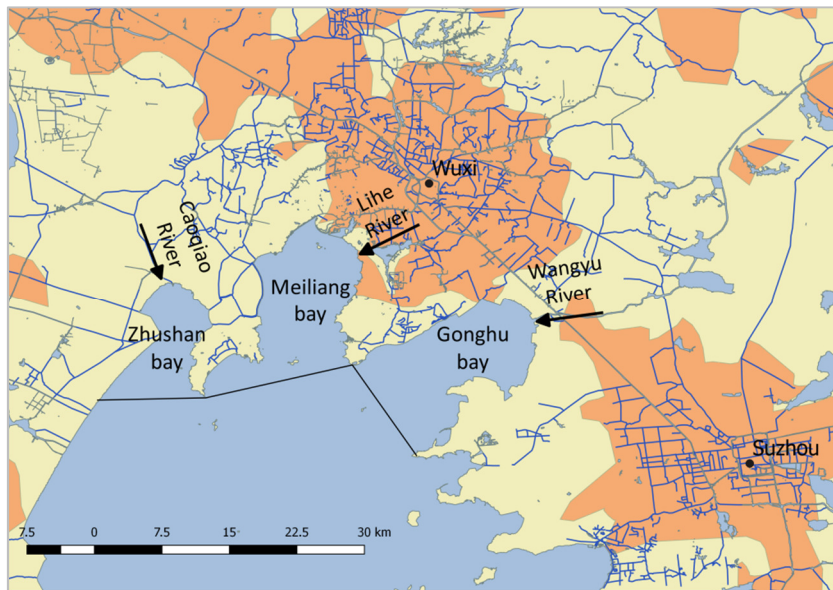


Abbildung 4.7: Untersuchte Bereiche des Tai-Sees.

In den letzten Jahren wurde das Gebiet durch eine rasante wirtschaftliche Entwicklung und eine schnell anwachsende Bevölkerung geprägt (Schmidt et al., 2016). Infolge dieser Entwicklung steigt der Bedarf an Brauch- und Trinkwasser. Doch das Wasser des Tai-Sees ist durch industrielle und landwirtschaftliche Einträge stark mit organischen Schadstoffen, Nährstoffen wie Stickstoff und Phosphor sowie Schwermetallen belastet (Schmidt et al., 2016). Die schlechte Rohwasserqualität führte in den vergangenen Jahren wiederholt zu Versorgungsschwierigkeiten. 2007 kam es zu einem Blaualgenausbruch. Der durchschnittlich nur zwei Meter tiefe Tai-See kippte um und die Wasserversorgung der Millionenstadt Wuxi war tagelang unterbrochen.

Die Wasserverschmutzung am Tai-See wird als äußerst schwerwiegend eingestuft, da die Wasserqualität durch eine Vielzahl von Verschmutzungsquellen, wie z. B. durch kommunale, landwirtschaftliche oder industrielle Abwässer bedroht ist. Die vielen Vieh-, Geflügel- und Schweinefarmen im Einzugsgebiet des Sees werden als mögliche Verschmutzungsquellen angesehen (Zhang et al., 2012).

Hinsichtlich der Produktion und Einsatzes von Antibiotika sowie die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen ist die Republik China von besonderem Interesse. Basierend auf Marktdaten ist China der weltweit größte Hersteller und Konsument von Antibiotika (China Business Guide (CBG), 2014). Eine Studie ergab, dass sich im Jahr 2013 in China die Gesamtproduktion an Antibiotika auf ca. 248.000 t und der Verbrauch auf ca. 162.000 t belief (Zhang et al., 2015). Im Vergleich zu Industrieländern ist der Antibiotikakonsum in China mit Tagesdosen pro 1000 Einwohner und Tag fast fünffach so hoch wie in den USA und Europa (Zhang et al., 2015). Darüber hinaus betrug der Antibiotikaverbrauch für die Tierhaltung in China 83.200 t, während in den Vereinigten Staaten 14.618 t eingesetzt wurden (Zhang et al., 2015). Dieser erhebliche Einsatz von Antibiotika hat auch deutliche Auswirkungen auf die Resistenzsituation in China (Ying et al., 2017). In einem Bericht der WHO konnten für neun spezifische Krankheitserreger in China höhere Resistenzraten als im globalen Durchschnitt ermittelt werden (World Health Organisation

(WHO), 2014). Die Überwachung von Tieren ergab ein hohes Resistenzniveau und zunehmende Resistenzen bei Bakterien tierischen Ursprungs (Ying et al., 2017). In den letzten zehn Jahren hat die chinesische Regierung erste Schritte unternommen, um den übermäßigen Gebrauch von Antibiotika einzudämmen.

In Hinblick auf den Tai-See fördert die hohe Bevölkerungsdichte im Einzugsgebiet den Missbrauch von Antibiotika nicht nur für den menschlichen Gebrauch, sondern auch für den veterinärmedizinischen Gebrauch. Es werden große Mengen an Antibiotika eingesetzt, um Tiererkrankungen zu bekämpfen und die Nahrungsmittelversorgung sicherzustellen. Tetracycline, Sulfonamide und Bacitracin sind die Antibiotika, die am häufigsten in diesem Gebiet eingesetzt werden (Taihu Basin Authority, 2016). Der Tai-See ist eine Schwerpunktregion eines derzeit laufenden chinesischen Programmes zur Förderung der Wissenschaft und Technologie mit dem Ziel der Kontrolle und Steuerung der Wasserverschmutzung und daher von wissenschaftlicher und politischer Bedeutung (Dohmann et al., 2016; Schmidt et al., 2016). Vor diesem Hintergrund wurden Untersuchungen zum Vorkommen und zur Verteilung am Tai-See durchgeführt. Um diese Resistenzgene möglichen Eintragspfaden zuordnen zu können, wurden diese Untersuchungen mit MST-Analysen gekoppelt.

Insgesamt wurden vier große Probennahmekampagnen (November 2015, Juni 2016, Februar 2017 und September 2017) durchgeführt. Die Kampagnen wurden so gelegt, dass alle Jahreszeiten abgedeckt wurden. Im Untersuchungsgebiet herrscht ein subtropisches feuchtes Monsunklima. Die jährliche Durchschnittstemperatur beträgt 16,1 °C, wobei die Temperaturen im Januar am niedrigsten (minimale Temperatur: -9,0 °C) und im August am höchsten (maximale Temperatur: 36,7 °C) sind (Qian et al., 2017). Die jährliche Niederschlagsmenge beträgt im Durchschnitt 1.180 mm. Der Niederschlag fällt hauptsächlich während der Hochwassersaison von Mai bis September (60 % des jährlichen Niederschlags), wobei man von Juli bis September von Taifunregen spricht (Qian et al., 2017). Insbesondere die Probennahme im Juni 2016 war von starken Regenfällen geprägt. Zwischen dem 26.6. und dem 16.7. wurden 76 h Niederschlag mit einer Gesamtniederschlagsmenge von 382,8 mm registriert (Yang et al., 2019). Darüber hinaus waren die vier Probennahmekampagnen durch unterschiedliche Lufttemperaturen gekennzeichnet. Im Dezember und Februar lag die Temperatur zwischen 0 und 17 °C, während im Juli und September viel höhere Temperaturen erreicht wurden (25-32 °C bzw. 19-29 °C).

4.6 Vergleich der Untersuchungsgebiete

Wie vorher beschrieben zeichnen sich die Einzugsgebiete, die im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht wurden, durch unterschiedliche Charakteristika aus. Für einen besseren Überblick sind in der nachfolgenden Tabelle die wichtigsten Merkmale der einzelnen Untersuchungsgebiete zusammengefasst.

Tabelle 4.1: Charakteristika der verschiedenen Untersuchungsgebiete.

Einzugsgebiet	Rohwasser	Mögliche Eintragsquellen	Besonderheiten
Rhein	Oberflächenwasser	diffus	
Gallusquelle	Grundwasser (Karst)	Regenüberlaufbecken (Mischkanalisation) Wildtiere, Gülle (Ackerbau), Abwasser,	Karstquelle
Tiefwerder	Grundwasser (Oberflächenwasser- beeinflusst)	Mischkanal- und Regenüberläufe, Badebetrieb (saisonal) Rot- und Schwarzwild,	Einfluss des Ablaufs vom Klärwerk Ruhleben nachgewiesen, Straßen ohne Kanalisation vorhanden
Kaulsdorf	reines Grundwasser	Hunde, Badebetrieb (saisonal), Klärgruben	Hunderauslaufgebiet
Talsperre Herbringhamen	Oberflächenwasser (Talsperre)	Wildtiere, Gülle (Ackerbau), Abwasser	relativ kleines Einzugsgebiet, Beprobung mehrerer Zuläufe möglich
Talsperre Kerspe	Oberflächenwasser (Talsperre)	Wildtiere, Gülle (Ackerbau), Abwasser	relativ kleines Einzugsgebiet, Beprobung mehrerer Zuläufe möglich
Tai-See	Oberflächenwasser (natürlicher See)	diffus	Wasserqualität wird durch starke Verschmutzungen beeinflusst, sehr großes Einzugsgebiet mit hoher Bevölkerungsdichte.

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die nachfolgende Abbildung gibt einen Überblick über die chronologische Reihenfolge der verschiedenen Versuchsphasen sowie die jeweiligen Untersuchungsgebiete und Methoden.

	Untersuchungsgebiet(e)	Ziel(e)	Methode(n)
Phase 1	Rhein bei Düsseldorf-Flehe	<ul style="list-style-type: none"> Prüfung des Kulturbasierten Nachweises von Toxingenen als MST-Verfahren 	<ul style="list-style-type: none"> Nachweis von Virulenzgenen in <i>E.coli</i>-Isolaten
Phase 2	Gallusquelle	<ul style="list-style-type: none"> Etablierung von Datenbank-unabhängigen MST-Verfahren Identifizierung von fäkalen Eintragsquellen 	<ul style="list-style-type: none"> <i>Bacteroides</i>-basierter qPCR-Nachweis <ul style="list-style-type: none"> unspezifisch Mensch Wiederkäuer mtDNA-basierter qPCR-Nachweis <ul style="list-style-type: none"> unspezifisch Mensch Rind Huhn Pferd qPCR-Nachweis des HPyV DGGE
Phase 3	Einzugsgebiete der WW Tiefwerder und Kaulsdorf sowie der Talsperren Herbringhausen und Kerspe	<ul style="list-style-type: none"> Erweiterung der Datenbank-unabhängigen MST-Verfahren in Hinblick auf weitere Verursacher Identifizierung von fäkalen Eintragsquellen 	<ul style="list-style-type: none"> <i>Bacteroides</i>-basierter qPCR-Nachweis <ul style="list-style-type: none"> unspezifisch Mensch Wiederkäuer Schwein Hund mtDNA-basierter qPCR-Nachweis <ul style="list-style-type: none"> unspezifisch Mensch Rind Huhn Pferd Hund Katze Schwein Schaf
Phase 4	Tai-See	<ul style="list-style-type: none"> Kopplung des Nachweises von Antibiotikaresistenzgenen und MST-Markern 	<ul style="list-style-type: none"> <i>Bacteroides</i>-basierter qPCR-Nachweis <ul style="list-style-type: none"> unspezifisch Mensch Wiederkäuer Schwein Hund qPCR-Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen

Abbildung 5.1: Übersicht über die verschiedenen Versuchsphasen.

5.1 Nachweis von Virulenzgenen als Microbial Source Tracking-Werkzeug

Verfahren, die auf dem Nachweis von Toxin- und Virulenzgenen beruhen, können laut Literatur zur Identifizierung von fäkalen Eintragsquellen genutzt werden. Aus diesem Grund wurden 47 *E. coli*-Isolate, die aus dem Rhein isoliert wurden, auf entsprechende Gene untersucht.

Der Nachweis von *E. coli* in Trinkwasser wird seit vielen Jahren als Hinweis für eine Verunreinigung durch Fäkalien verwendet. Neben den nicht-krankheitserregenden *E. coli*-Stämmen wurden in den letzten Jahrzehnten immer neue *E. coli*-Stämme beschrieben, die Darmerkrankungen mit Durchfällen verursachen. Die fünf pathogenen Varianten von *E. coli* sind: Enteropathogene *E. coli* (EPEC), enterotoxische *E. coli* (EHEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) und enteroaggregative *E. coli* (EAEC). Jede der fünf krankheitserregenden Varianten weist durch unterschiedliche Pathogenitätsfaktoren einen eigenständigen Pathomechanismus auf.

Es wurden multiple PCR-Assays durchgeführt, um ein Spektrum von elf Virulenzgenen – und damit Pathogenitätsfaktoren – nachzuweisen. Von elf Virulenzgenen wurden nur sechs in 47 *E. coli*-Isolaten nachgewiesen (siehe Tabelle 5.1). Die Gene *ipaH* und *bfp* wurden jeweils in einem Isolat und die Gene *eaeA*, *stx2*, *aagR* und *astA* wurden in jeweils zwei Isolaten gefunden. Nur ein Isolat trug zwei Virulenzgene (*aagR* und *bfp*).

Tabelle 5.1: Auftreten von Virulenzgenen in *E. coli*-Isolaten aus der Umwelt. Vergleich der Ergebnisse aus dieser Studie mit publizierten Daten (- = nicht analysiert).

Referenz	Untersuchungsgebiet	<i>E. coli</i> Isolate mit Positivbefund in %										
		<i>eaeA</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>ehxA</i>	<i>ipaH</i>	LT	ST	<i>aagR</i>	<i>bfp</i>	<i>astA</i>	<i>cdtB</i>
diese Arbeit	Rhein, Deutschland	4,3	0,0	4,3	0,0	2,1	0,0	0,0	4,3	2,1	4,3	0,0
Sidhu et al., 2013	Brisbane, Australien	56	6	10	13	14	2	4	29	24	69	8
Chen et al., 2011	Fluss Minjiang, China	-	-	0,4 ^a	-	-	-	-	-	-	24,8	-
Shelton et al., 2006	Baltimore, USA	96	26 ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hamilton et al., 2010	Avalon Bucht, USA	3,6	0,0	0,0	-	-	0,0	0,0	-	-	-	-
Ram et al., 2008	Fluss Gomti, India	26,7	33,3	22,2	-	-	21,1	21,1	-	-	-	-

^astx2e

^bstx1 or stx2

An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass die Anwesenheit eines einzelnen oder mehrerer Virulenzgene in einem *E. coli*-Stamm nicht notwendigerweise anzeigt, dass ein Stamm pathogen ist. Nur wenn bestimmten Virulenzgen-Kombinationen in einem Stamm vorliegen (siehe Tabelle 3.1), kann eine Erkrankung verursacht werden (Boerlin et al., 1999). Die pathogenen *E. coli* unterliegen einem komplexen mehrstufigen Mechanismus der Pathogenese, der eine Anzahl von Virulenzfaktoren in Abhängigkeit vom Pathotyp umfasst (Kaper et al., 2004).

EAEC verursacht bei Kindern und Erwachsenen anhaltenden Durchfall und wird durch das Vorhandensein von hitzestabilem Enterotoxin-1 (*east1*) zusammen mit *aggR* definiert (Kaper et al., 2004). In dieser Studie wurde das Gen, welches das enteroaggregative *E. coli*-hitzestabile Enterotoxin-1 (*astA*) von *E. coli* kodiert, in zwei Isolaten nachgewiesen. Im Gegensatz dazu fanden andere Studien eine hohe Prävalenz von *E. coli*, die das *astA*-Gen tragen, für Oberflächenwasser (Masters et al., 2011) und Regenwasser (Sidhu et al., 2013). Es ist zu berücksichtigen, dass viele kommensale *E. coli*-Isolate in den Proben vorhanden waren.

Alle *E. coli*-Isolate wurden auf das Vorhandensein des *aggR*-Gens gescreent, um zu bestimmen, ob sie zum EAEC-Pathotyp gehören (der sowohl *astA*- als auch *aggR*-Gene trägt). Das *aggR*-Gen wurde in zwei Isolaten nachgewiesen, jedoch nicht in denjenigen, die für das *astA*-Gen positiv waren. Daher war kein bestätigter EAEC-Pathotyp unter den *E. coli*-Isolaten.

Das *eaeA*-Gen, das für ein Intiminprotein kodiert, wurde auch in nur zwei der 47 *E. coli*-Isolate nachgewiesen, was seine extrem niedrige Prävalenz im Rhein zeigt. Dieses Gen ist für die Bindung an Wirts-Epithelzellen sowohl in den EHEC- als auch EPEC-Pathotypen erforderlich. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu früheren Untersuchungen, in denen über eine hohe Prävalenz des *eaeA*-Gens (bis zu 96 %) in unterschiedlichen Oberflächenwässern (Bäche, Flüsse und Brackwasser) in Amerika und Australien berichtet wurde (Masters et al., 2011; Shelton et al., 2006; Sidhu et al., 2013).

EHEC verursacht hämorrhagische Kolitis und ein hämolytisch-urämisches Syndrom beim Menschen. Virulenzfaktoren sind ein Intimin-Protein (*eaeA*-Gen) und Shiga-Toxine (*stx1*- und *stx2*-Gene; (Boerlin et al., 1999). Das *stx2*-Gen wurde in 4,3 % der *E. coli*-Isolate nachgewiesen, wohingegen das *stx1*-Gen in keinem Isolat gefunden wurde; *eaeA*- und *stx2*-Gene wurden nicht in den gleichen Isolaten nachgewiesen.

Alle 47 *E. coli*-Isolate wurden auch auf das Vorhandensein des *bfp*-Gens getestet, um festzustellen, ob sie zum EPEC-Pathotyp gehören. Typische EPEC-Stämme tragen die LEE-Pathogenitätsinsel, die für mehrere Virulenzfaktoren kodiert, einschließlich des Intimin-Proteins (*eaeA*) und des Plasmid-kodierte Bündel-bildenden Pilus (*bfp*), die die Adhäsion an Darmepithelzellen vermitteln (Hamilton et al., 2010; Kaper et al., 2004). In dieser Studie wurde das *bfp*-Gen zusammen mit *eaeA* in keinem der Isolate nachgewiesen. Insgesamt wurde das *bfp*-Gen in nur einem Isolat detektiert. In ähnlicher Weise war die Prävalenz des Invasionsplasmid-Antigens H (*ipaH*), das üblicherweise von EIEC-Stämmen getragen wird (Guion et al., 2008), ebenfalls sehr niedrig (4,3 %).

Insgesamt wurden neun *E. coli*-Stämme, die Virulenzgene trugen, gefunden. Von diesen neun Isolaten konnten fünf den beiden phylogenetischen Gruppen B2 und D zugeordnet werden (nicht-kommensale). In Übereinstimmung mit diesen Befunden zeigten auch andere Studien zur phylogenetischen Einordnung von *E. coli*-Stämmen mit Virulenzfaktoren, dass pathogene *E. coli*-Stämme, die mit schweren akuten Diarrhöen assoziiert sind, außerhalb der Gruppen B2 und D zu finden sind (Escobar-Paramo et al., 2004a; Escobar-Paramo et al., 2004b). Insgesamt konnten keine enteropathogenen *E. coli* im deutschen Rhein bei Düsseldorf nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu diesem Befund, belegen andere Studien das Vorhandensein von *E. coli*-Bakterien

mit Virulenzfaktoren in der aquatischen Umwelt – und insbesondere in Oberflächenwassersystemen (Anastasi et al., 2012; Chen et al., 2011; Hamilton et al., 2010; Koczura et al., 2013; Nontongana et al., 2014; Ram et al., 2004; Sidhu et al., 2013). Beispielsweise wurden in der Avalon Bay in Kalifornien häufig potenzielle EPEC-Bakterien nachgewiesen (Hamilton et al., 2010). In einer anderen Studie trug etwa ein Viertel, der aus dem Minjiang-Fluss in China isolierten *E. coli*, mindestens eines der elf untersuchten Virulenzgene (Chen et al., 2011). In ähnlicher Weise wurde auch über die Anwesenheit von EPEC-, EIEC-, EHEC- und ETEC-Pathotypen in subtropischen Oberflächenwasserproben aus Brisbane, Australien berichtet (Sidhu et al., 2013).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass enteropathogene *E. coli* in den wärmeren Oberflächengewässern in Indien, USA, China und Australien potenziell häufiger vorkommen als in den kalten Gewässern Deutschlands. Dies könnte möglicherweise auf ein besseres Überleben der Virulenzgen-tragenden *E. coli*-Bakterien zurückzuführen sein. Es wurde berichtet, dass tropische aquatische Ökosysteme mit bioverfügbarem Nährstoff einen idealen Lebensraum für *E. coli* darstellen (Winfield und Groisman, 2003).

Studien zeigen, dass Rinder und andere Wiederkäuer, wie Schafe, Ziegen und Wild, ein wichtiges Reservoir für Shigatoxin-bildende *E. coli* sind (Ishii et al., 2007; Mainil und Daube, 2005; Paton und Paton, 1998), während EPEC Stämme bei Menschen und Tieren nachgewiesen werden können (Hamilton et al., 2010; Ishii et al., 2007). Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass das Auftreten von Virulenzgenen in *E. coli*-Stämmen, die aus dem Rhein isoliert wurden, gering sind. Diese Tatsache ist zwar positiv aus Sicht der mikrobiologischen Wasserqualität, stellt aber eine Einschränkung der Nutzung von Virulenzgenen als Marker zur Identifizierung von möglichen fäkalen Eintragsquellen dar. Diese Einschränkung betrifft sowohl den Kultur-basierten Ansatz als auch die Kultur-unabhängigen Verfahren (PCR-Nachweis dieser Gene in der Gesamt-DNA einer Probe). Insbesondere die Kultur-basierte Untersuchung einer ausreichenden Anzahl von *E. coli*-Isolaten ist extrem zeit- und kostenaufwendig. Für die Untersuchung von komplexen Einzugsgebieten, die nicht stark kontaminiert sind, sollten empfindlichere MST-Methoden in Betracht gezogen werden.

5.2 Datenbank-unabhängige und Kultur-unabhängige Microbial Source Tracking-Verfahren

5.2.1 Etablierung Datenbank-unabhängiger und Kultur-unabhängiger Microbial Source Tracking-Verfahren

In den letzten Jahren wurde die Entwicklung von Methoden zur Herkunftsbestimmung von mikrobiellen Verunreinigungen vorangetrieben. Viele dieser Methoden basieren auf molekularbiologischen Techniken – insbesondere auf der PCR.

Mit Hilfe der PCR können genetische Marker, die Informationen über den Ursprung einer fäkalen Kontamination liefern, nachgewiesen werden. Vielversprechende genetische Marker für MST-Anwendungen sind u. a. wirtsspezifische *Bacteroides* 16S rRNA-Genabschnitte (Bernhard und Field, 2000b; Layton et al., 2006; Reischer et al., 2007; Seurinck et al., 2005) sowie Bereiche der eukaryotischen mitochondrialen DNA (mtDNA; (Kortbaoui et al., 2009; Schill und Mathes, 2008). Alle diese Marker können mit Hilfe von real-time PCR-Verfahren nachgewiesen und quantifiziert werden. Dieser Nachweis hat den Vorteil, dass keine Kultivierung der Organismen notwendig ist. Deshalb können viele Proben relativ schnell und kostengünstig analysiert werden.

Zur Etablierung von molekularbiologischen Verfahren zur Identifizierung von fäkalen Eintragsquellen wurde folgendermaßen vorgegangen:

- Literaturrecherche zur Identifizierung geeigneter MST-Marker und Primer
- Auswahl von Primersystemen anhand der Literatur (dabei berücksichtigt wurden GC-Gehalt, Länge der Oligonukleotide, Wirtsspezifität (theoretisch ermittelt durch Abgleich mit der Sequenzdatenbank des NCBI) sowie Länge der Amplikons)
- Überprüfung der ausgewählten Primersysteme durch erste PCR-Untersuchungen mit einem eingeschränkten Probenumfang
- Vergleichsuntersuchungen von Primersystemen mit gleichen Zielsequenzen
- Herstellung von Standards, die eine Quantifizierung mittels qPCR ermöglichen
- Orientierende PCR-Versuche
- Optimierung der PCR-Assays (Annealingtemperatur, Elongationszeit)

In der zweiten Phase der Dissertation wurden MST-Werkzeuge für die Untersuchung von fäkalen Einträgen in die Gallusquelle etabliert. Die oberste Priorität wurde auf die Identifizierung humaner Kontaminationen gelegt, da das Regenrückhaltebecken im Einzugsgebiet der Gallusquelle bereits im Vorfeld als mögliche Ursache für mikrobiologische Verunreinigungen im Quellwasser identifiziert werden konnte. Auch in Hinblick auf die Untersuchung weiterer Einzugsgebiete sind humane Einträge von besonderer Wichtigkeit, da sie im Vergleich mit anderen Kontaminationen durch eine höhere hygienische Relevanz charakterisiert sind. Zusätzlich wurden bei der Auswahl folgende mögliche fäkale Eintragsquellen berücksichtigt: Huhn (großer Hühnerhof im Einzugsgebiet), Rind (Rinderhaltung), Pferd (Pferdehaltung) und Wild (60 % des Einzugsgebietes ist bewaldet). An erster Stelle stand eine umfangreiche Literaturrecherche zum Thema MST. In dieser Recherche wurde besonderes Augenmerk auf vielversprechende Marker für MST-Zwecke sowie deren Nachweisverfahren gelegt. Am Ende der Literaturrecherche stand die Auswahl von *Bacteroides*-, mtDNA- und auch Bifidobakterien-basierten Primersystemen (siehe Tabelle 5.2).

Tabelle 5.2: Getestete Primersysteme in Phase 2.

Target	Bezeichnung	Primerpaar (5'-3')	Literaturquelle
Bacteroides-basierte Systeme			
Wirtsun-spezifisch	Bac32F	AACGCTAGCTACAGCCTT	Bernhard und Field, 2000b
	Bac708R	CAATCGGAGTTCTTCGTG	
Wirtsun-spezifisch	AlIBac296f	GAGAGGAAGGTCCCCAC	Layton et al., 2006
	AlIBac412r	CGCTACTTGGCTGGTTCAG	
Mensch	HF183	ATCATGAGTTCACATGTCCG	Bernhard und Field, 2000a
	Bac708R	CAATCGGAGTTCTTCGTG	
Mensch	HF183	ATCATGAGTTCACATGTCCG	Seurinck et al., 2005
	BacHum-241r	TACCCCGCCTACTATCTAATG	
Mensch	BacH_f	CTTGGCCAGCCTTCTGAAAG	Reischer et al., 2007
	BacH_r	CCCCATCGTCTACCGAAAATAC	
Wiederkäuer	CF128F	CCAACYTTCCCGWTACTC	Bernhard und Field, 2000a
	Bac708R	CAATCGGAGTTCTTCGTG	
Wiederkäuer	BacR_f	GCGTATCCAACCTTCCCG	Reischer et al., 2006
	BacR_r	CATCCCCATCCGTTACCG	
Huhn	CP2-9F	GTAAGACAGCAACCCCATGTA	Lu et al., 2007
	CP2-9R	ACCTATGGTTCAACACGCTTTA	
Pferd	Ho-622F	TGCGTAGGCGGGAAGTCA	Silkie und Nelson, 2009
	Ho-722R	GAATCCATCGCCCTCTAGTGT	
mtDNA-basierte Systeme			
Art-unspezifisch	Umito1-G	AAACTGGGATTAGATACCCAC	Kortbaoui et al., 2009
	Umito1-D	CTTACCWTGTTACGACTTG	
Art-unspezifisch	Umito2-G	AAGACGAGAAGACCCTRTGGA	Kortbaoui et al., 2009
	Umito2-D3	TGATCCAACATCGAGGTCGT	
Art-unspezifisch	Umito2-G	AAGACGAGAAGACCCTRTGGA	Kortbaoui et al., 2009
	Umito2-D2	GATTGCGCTGTTATCCCT	
Mensch	Humito2-G	AGCCCTTCTAAACGCTAATCCAAGCCT	Martellini et al., 2005
	Humito2-D	CTTGTCAGGGAGGTAGCGATGAGA	
Mensch	Humito11-G	CCACTACTAGGCCTCCTCCTA	Martellini et al., 2005
	Humito11-D	TAGCGATGAGAGTAATAGATAGGG	
Mensch	Human Cyt b forward	AGTCCCACCCTCACACGATTCTTT	Schill und Mathes, 2008
	Human Cyt b reverse	AGTAAGCCGAGGGCGTCTTTGATT	
Rind	Bomito2-G	CATAGCAATTGCCATAGTCC	Kortbaoui et al., 2009
	Bomito2-D	TTTTTCGATTGTGCCGGCCGT	
Rind	BomitoN2-G	CCCTCTTACTAATTCTAGCTC	Kortbaoui et al., 2009
	BomitoN2-D	TTAGCACTAGGATGAGGAGA	
Rind	Cow Cyt b forward	AATGCATTATCGACCTTCCAGCC	Schill und Mathes, 2008
	Cow Cyt b reverse	ACGTCTCGGCAGATATGGGTAACA	
Huhn	Ckmito1-G	ACCCTATTTGACTCCCTCAA	Kortbaoui et al., 2009
	Ckmito1-D	ATGTCGACCAGGGGTTTATG	
Huhn	CkmitoN1-G	CCCCACACTAACAAGCAAT	Kortbaoui et al., 2009
	CkmitoN1-D	GGTTGTAAGGTGGTCGTGAT	
Huhn	Chicken Cyt b forward	TAGCCATGCACTACACAGCAGACA	Schill und Mathes, 2008
	Chicken Cyt b reverse	TTTGCGTGGAGATTCCGGATGAGT	
Pferd	Horse Cyt b forward	AGGAGCAACAGTCATCACGAACCT	Schill und Mathes, 2008
	Horse Cyt b reverse	AAATGTACGACTACCAGGGCTGTG	
Sonstige Systeme			
Mensch	esp-F	TATGAAAGCAACAGCACAAAGTT	Scott et al., 2005
	esp-R	ACGTCGAAAGTTTCGATTTCC	
Mensch	HPyVsF	AGTCTTTAGGGTCTTCTACC	Arthur et al., 1989
	HPvVsR	GGTGCCAACCTATGGAACAG	

Die ausgewählten Primer wurden in ersten Vergleichsuntersuchungen eingesetzt. Hierzu wurde die DNA aus Kotproben extrahiert und mittels PCR analysiert. Auf diese Weise konnten vielversprechende Primersysteme identifiziert werden.

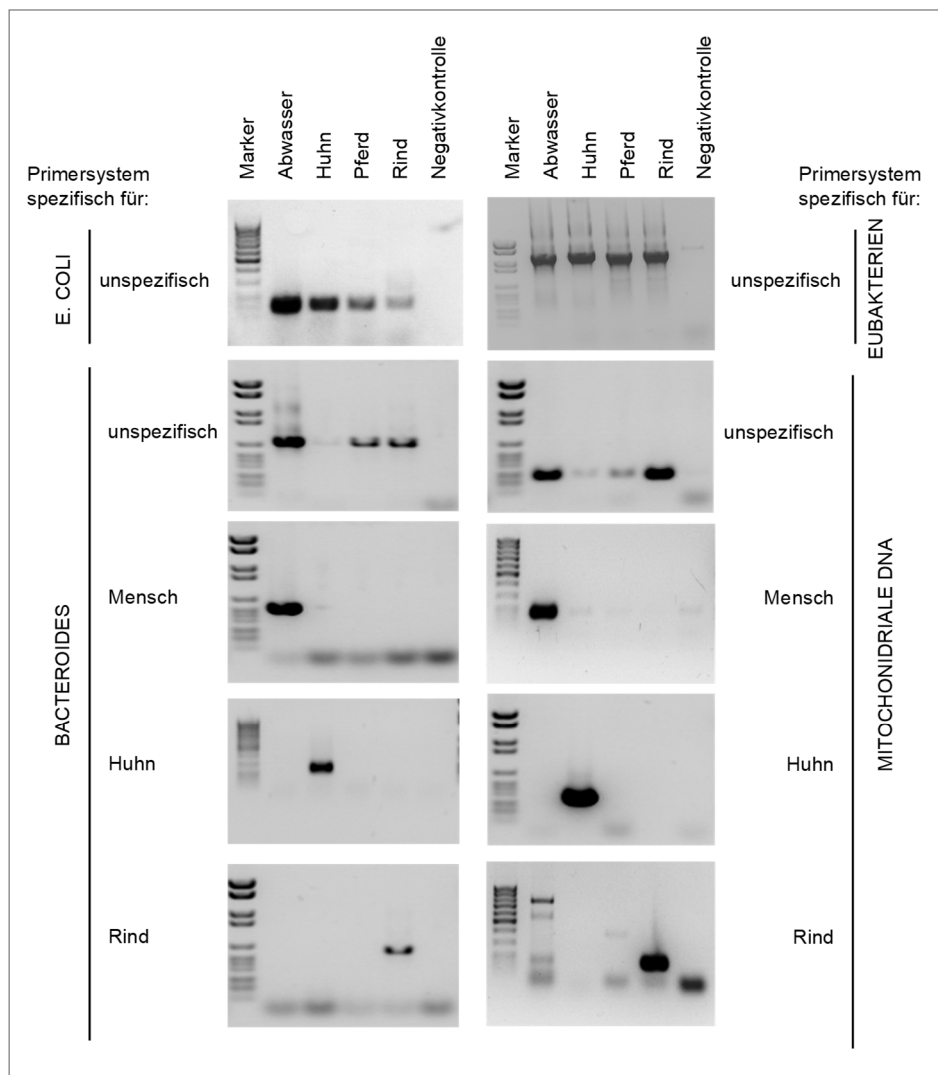


Abbildung 5.2: Ausgewählte PCR-Ergebnisse der Untersuchung von Abwasser- und Kotproben auf wirtsspezifische Marker. Die Abbildung zeigt Agarosegele mit spezifisch amplifizierten PCR-Produkten (schwarze Banden) in den Spuren der Kotproben. Die erste Gel-Spur zeigt immer eine DNA-Leiter mit DNA-Fragmenten bekannter Größe.

Die Abbildung 5.2 zeigt Ausschnitte aus mehreren Agarosegelen, auf denen PCR-Ansätze mit verschiedenen Primersystemen elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Die verwendeten Primer führten bei den Proben zu erwarteten Produkten der richtigen Länge. D. h. humanspezifische mtDNA- und *Bacteroides*-Marker wurden nur in den beiden untersuchten Abwasserproben und Hühner-spezifische Marker nur in der Hühnerkotprobe nachgewiesen.

Im nächsten Schritt wurden Prozesskontrollen für den PCR-Nachweis etabliert und die optimalen Temperatur-Bedingungen für die Amplifikation ermittelt. Zu den Prozesskontrollen zählen DNA-Standards mit definierter Genkopienzahl (siehe Kapitel 3.2.2.2), Negativkontrollen sowie Kontrollen zur Erfassung möglicher PCR-inhibierender Effekte (Ausschluss falsch negativer Ergebnisse). Anschließend wurden unter Einsatz der DNA-Standards und Realproben Temperaturprofile für die Amplifikation ermittelt, die einen möglichst spezifischen Nachweis der

ausgewählten Sequenzen ermöglichen und die gesetzten Qualitätskriterien (siehe Kapitel 3.2.2) erfüllen. Hierzu wurden Gradienten-real-time-PCR-Läufe durchgeführt.

Nach Auswertung aller Ergebnisse und unter Berücksichtigung der Effizienzen der PCR-Reaktionen, der Sensitivitäten sowie den Spezifitäten, wurden acht Primersysteme als besonders geeignet erachtet. Insgesamt standen für die Arbeiten im Einzugsgebiet der Gallusquelle MST-Verfahren zur Erfassung von wirtsunspezifischen, humanspezifischen und Wiederkäuerspezifischen *Bacteroides*-Sequenzen zur Verfügung. Die etablierten mitochondrialen Marker umfassen Art-unspezifische sowie human-, Rinder-, Hühner- und Pferde-spezifische DNA-Bereiche.

In der dritten Phase der Arbeit wurde diese „MST-Toolbox“ um weitere Nachweissysteme für die Identifizierung von fäkalen Einträgen durch Verursacher wie z. B. Hunde und Wildtiere erweitert. Es wurden publizierte Primersequenzen für den Nachweis von wirtsspezifischen Sequenzen für Hunde, Katzen, Vögel, Schweine, Schafe und Rotwild ausgewählt.

Tabelle 5.3: Getestete Primersysteme in Phase 3.

Target	Bezeichnung	Primerpaar (5'-3')	Literaturquelle
Bacteroides-basierte Systeme			
Schwein	Pig2 Bac 41 F Pig2 Bac 163 R	GCATGAATTTAGCTTGCTAAATTTGAT ACCTCATACGGTATTAATCCGC	Mieszkina et al., 2009
Schwein	PF163F Bac708R	GCGGATTAATACCGTATGA CAATCGGAGTTCTTCGTG	Dick et al., 2005a
Rind	Cow M3 F Cow M3 R	CCTCTAATGGAAAATGGATGGTATCT CCATACTTCGCCTGCTAATACCTT	Shanks et al., 2008
Pferd	HoF795 Bac 708 R	CCAGCCGTAAAATAGTCCG CAATCGGAGTTCTTCGTG	Dick et al., 2005a
Hund	BacCan 545 f BacUni 690 r	GGAGCGCAGACGGGTTTT CAATCGGAGTTCTTCGTGATATCTA	Kildare et al., 2007
Hund	DF 475 F Bac708R	CGCTTGATGTACCGGTACG CAATCGGAGTTCTTCGTG	Dick et al., 2005b
Hund	Dog132F Bac708R	CCTTCCGTACACTCAGGG CAATCGGAGTTCTTCGTG	Field und Bernhard, 2004
Katze	Cat131F Bac 708 R	ACCTGCCTTCCACTCG CAATCGGAGTTCTTCGTG	Field und Bernhard, 2004
Wild	EF 447 F EF 990 R	AATAACACCATCTACGTGTAGA GCCTGTCCAGTGCAATTTAA	Dick et al., 2005b
Kanadagans	CG1F CG1R	GTAGGCCGTGTTTTAAGTCAGC AGTTCCGCCTGCCTTGCTA	Fremaux et al., 2010
Kanadagans	CG2F CG2R	ACTCAGGGATAGCCTTTTCA ACCGATGAATCTTTCTTTGTCTCC	Fremaux et al., 2010
mtDNA-basierte Systeme			
Schwein	Swine forward Swine reverse	ACAGCTGCACTACAAGCAATGC GGATGTAGTCCGAATTGAGCTGATTAT	Caldwell et al., 2007
Schwein	PomitoN4-G PomitoN4-D	CAGTAATGTCCGGAACCATAG TGTGGTTGCTGAGCTGTGGATT	Kortbaoui et al., 2009
Schwein	Pig Cyt b forward Pig Cyt b reverse	CGACAAAGCAACCCTCACACGATT TAGGGTTGTTGGATCCGGTTTCGT	Schill und Mathes, 2008
Schaf	OvmitoN2-G OvmitoN2-D	TACACTGTTACAGGCATCAG CGTGAAGTTAGTTAGGAGAGTA	Kortbaoui et al., 2009
Schaf	Sheep Cyt b forward Sheep Cyt b reverse	ACGCATTCAATTGATCTCCAGCTC TCGGCAAATGTGGGTTACAGAGGA	Schill und Mathes, 2008
Hund	Dog Cyt b forward Dog Cyt b reverse	CCACAGCATTCATGGGCTATGTACT AGTGCAGATGATGAAAGGGAGGAT	Schill und Mathes, 2008
Hund	Dog mt forward Dog mt reverse	GGCATGCCTTTCTTACAGGATTC GGGATGTGGCAACGAGTGTAATTATC	Caldwell et al., 2007
Katze	Cat forward Cat reverse	AACATTCATCGGCTGAGAGGCA GCTATGATGAAGCCTACGTCTCCAAAG	Caldwell et al., 2007
Wild	Deer forward Deer reverse	TAACCCGATTCTTCGCCTTCCTCT GTCTGCGTCTGATGGAATTCCTGAT	Caldwell et al., 2007
Bifidobacterium-basierte Systeme			
Wirtsun- spezifisch	Bif-F Bif-R	TTCGGGTTGTAAACCGCTTTT TACGTATTACCGCGGCTGCT	Gómez-Doñate et al., 2012
Mensch	Bif HM-F Bif-R	TCGGGGTGAGTGATCT TACGTATTACCGCGGCTGCT	Gómez-Doñate et al., 2012
Schwein	Bif PG-F Bif-R	CGCAAGTGAGTGATCTT TACGTATTACCGCGGCTGCT	Gómez-Doñate et al., 2012
Rind	Bif CW-F Bif-R	TTCGGCCGTGTTGAGT TACGTATTACCGCGGCTGCT	Gómez-Doñate et al., 2012
Geflügel	Bif PL-F Bif-R	GAGAGTGAGTGATCCCGTT TACGTATTACCGCGGCTGCT	Gómez-Doñate et al., 2012
Sonstige Systeme			
Ente	E2F-144 E2R-145	CCGGATACGCTCATATTAACC GAGGAAAGGATGGCCTCTG	Devane et al., 2007
Ente	E2F-109 E2R-145	CTCTCCCGGATTCTAGTCAC GAGGAAAGGATGGCCTCTG	Devane et al., 2007
Vögel	GFD F GFD R	TCGGCTGAGCACTCTAGGG GCGTCTCTTTGTACATCCCA	Green et al., 2012
Vögel	GFC F GFC R	CCCTTGTCGTTAGTTGCCATCATT GCCCTCGCGAGTTCGCTGC	Green et al., 2012

Insgesamt sind allerdings nur wenige Primersysteme für den Nachweis von fäkalen Einträgen durch Rotwild und Vögel publiziert. Dies ist darin begründet, dass in den Datenbanken bislang nur wenige Sequenzinformationen verfügbar sind. Dies limitiert die Identifizierung von wirtsspezifischen Sequenzen zum Zwecke des MST für diese Verursacher stark.

Analog zur Phase 2 wurden mit diesen Primersystemen Voruntersuchungen zur Spezifität durchgeführt. Unter anderem wurden auch Primer, die auf dem Nachweis von wirtsspezifischen Bifidobakterien-Sequenzen basieren, getestet. Das beispielhafte Ergebnis von zwei Primersystemen ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt. Das Beispiel in der Abbildung zeigt, dass die untersuchten Schweine-Marker bereits ohne Optimierung sehr spezifisch sind. Die Methode für die Hunde-Marker musste noch optimiert werden, um eine bessere Spezifität zu erreichen. Die Spezifität der Primer konnte durch die Ermittlung optimaler Temperaturprofile noch verbessert werden.

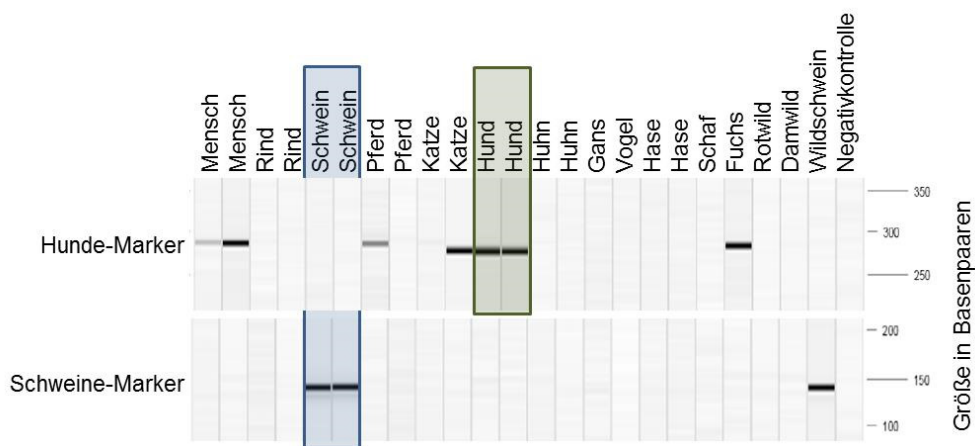


Abbildung 5.3: Orientierende Untersuchung zur Eignung von Hunde- und Schweine-spezifischen Markern.

Ausgehend von den Ergebnissen der Voruntersuchungen wurde die Auswahl an Primersystemen eingegrenzt. Es wurde entsprechende DNA-Standards mit definierter Kopienzahl für vielversprechende Primersysteme hergestellt und Temperaturprofile für die Amplifikation ermittelt. Um eine Aussage über die Empfindlichkeit der PCR-Nachweise machen zu können, wurden die Bestimmungsgrenzen (limits of quantification, LQ) anhand der Standardkurven festgelegt (siehe Abschnitt 5.2.2).

Für den Nachweis von Vögeln und Rotwild konnten keine spezifischen Primersysteme ausfindig gemacht werden. Im Gegensatz dazu wurde ein Primerpaar identifiziert, das den Nachweis von Hunde-spezifischen *Bacteroides*-Sequenzen ermöglicht. Allerdings erwies sich die Ermittlung eines optimalen Temperaturprogrammes als schwierig. Es konnte kein Temperaturprofil ermittelt werden, bei dem jegliche Kreuzreaktion ausgeschlossen werden kann, und eine ausreichend hohe Amplifikationseffizienz erreicht wird. Dies führt dazu, dass bei geringen Konzentrationen eine Coamplifikation von unspezifischen Produkten auftrat, die die Ergebnisse der Quantifizierung verfälschte. Durch die gelelektrophoretische Überprüfung der Amplifikatgröße konnte

sichergestellt werden, dass ein spezifisches Produkt vorhanden ist. Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse für den Hunde-spezifischen *Bacteroides*-Marker meist als positiv/negativ-Ergebnis dargestellt. Nur bei höheren Konzentrationen wird eine Kopienzahl ($>10^2$ Kopien/mL) angegeben.

Die zentrale Hypothese von MST ist, dass einige Mikroorganismen eine exklusive oder bevorzugte Assoziation mit dem Gastrointestinaltrakt einer bestimmten Wirtsspezies oder -gruppe haben, und dass diese wirtsassoziierten Mikroorganismen mit dem Kot abgegeben und in Wasserkörpern nachgewiesen werden können. Die detektierten Marker können extrem wirtsspezifisch sein, wie zum Beispiel das humane Polyomavirus (Ahmed et al., 2009a; Harwood et al., 2009; McQuaig et al., 2009) oder sie können sich durch eine begrenzte Wirtsspezifikationen auszeichnen (Harwood et al., 2009; Layton et al., 2006). Allerdings ist nicht nur die Spezifität der Marker sondern auch ihre Abundanz in den fäkalen Einträgen von entscheidender Bedeutung für die Praktikabilität des Nachweises. Bei der Etablierung der verschiedenen wirtsspezifischen Nachweissysteme wurde versucht, die Primersysteme mit hoher Spezifität (keine falsch-positiven Signale) und Sensitivität zu ermitteln.

Bifidobacterium-basierte Primersysteme erwiesen sich in den ersten Vorversuchen als nicht geeignet für MST-Studien, da mit entsprechenden Fäkalproben keine PCR-Produkte oder multiple Banden mit falsche Größe amplifiziert wurden. Aus diesem Grund wurden diese Systeme für die Untersuchung von Feldproben ausgeschlossen. Auch die Marker zum Nachweis fäkaler Eintrag durch Kanadagänse, Vögel (im Allgemeinen), Katzen und Wildtiere konnten nicht überzeugen, da in den ersten PCR-Untersuchungen keine ausreichende Wirtsspezifität (multiple Banden bei den Positivkontrollen und/oder Signale bei den Negativkontrollen) bzw. keine Amplifikation eines PCR-Produktes mit Positivproben beobachtet wurde.

Bifidobacterium spp. sind obligate Anaerobier, die als geeignete Kandidaten zum Nachweis von u. a. menschlicher Fäkalienbelastung vorgeschlagen wurden, da sie im menschlichen Darm vorkommen, aber selten in Tieren gefunden werden (Bonjoch et al., 2004; Mushi et al., 2010). Die Kultivierung dieser Bakterien kann schwierig sein, aber PCR- und qPCR-Methoden können dieses Problem umgehen (Bonjoch et al., 2004). Da es keine Hinweise auf eine Vermehrung der Bakterien außerhalb des Wirtes gibt, belegen Bifidobakterien kürzlich erfolgte Kontaminationen. Allerdings ist die Absterberate von Bifidobakterien höher als die Rate vieler Krankheitserreger (Mushi et al., 2010; Rhodes und Kator, 1999). Der Nachweis dieser Bakterien ist durch die mangelnde Empfindlichkeit der Methoden eingeschränkt (Ahmed et al., 2008a). Über die Persistenz und geografische Verteilung von *Bifidobacterium*-Markern ist wenig bekannt. Auch die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die Abundanz der Bifidobakterien in Kotproben zu gering ist, um diese Bakterien als MST-Marker zur Erfassung von geringen und moderaten Kontaminationen in Deutschland zu nutzen.

Die Primersysteme zum Nachweis von Vögeln wurden erstmals von Green et al. (2012) beschrieben. In dieser Studie wurden die entwickelten Werkzeuge als vielversprechende MST-Marker bezeichnet. PCR-Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeiten durchgeführt wurden, zeigten auch bei sehr hohen Annealingtemperaturen das Auftreten von multiplen Amplifikationsprodukten. Andere Primersysteme wie die *Bacteroides*-basierten Primersysteme HoF795/

Bac708R und CF193/Bac708R wurden nicht weiterverfolgt, weil sie mit DNA-Extrakten der entsprechenden Wirte (Pferd bzw. Rind) keine Signale ergaben. Grund für die widersprüchlichen Ergebnisse im Vergleich zur Literatur könnten geografische Unterschiede in der Verteilung der Marker und Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft sein.

Insgesamt konnten Primersysteme für den Nachweis von fäkalen Einträgen durch Hunde, Schweine und Schafe etabliert werden. Für diese Primersysteme wurden PCR-Standards hergestellt und optimale PCR-Bedingungen ermittelt, so dass diese zusätzlichen Marker für Untersuchungen im Einzugsgebietsmaßstab zur Verfügung standen.

Tabelle 5.4: Verfügbare Microbial Source Tracking-Toolbox.

	Bacteroides-basierte Assays	mtDNA-basierte Assays
Methoden Phase 2	<ul style="list-style-type: none"> • Wirtsunspezifisch (AllBac296f/ 412r) • Mensch (HF183/BacHum-241r) • Wiederkäuer (BacR_f/ _r) 	<ul style="list-style-type: none"> • Art-unspezifisch (Umito2-G/-D2) • Mensch (Human Cyt b forward/reverse) • Rind (Cow Cyt b forward/reverse) • Huhn (Chicken Cyt b forward/reverse) • Pferd (Horse Cyt b forward/reverse)
Zusätzliche Methoden Phase 3	<ul style="list-style-type: none"> • Hund (DF475 F/Bac708R) • Schwein (Pig2 Bac 41F/163 R) 	<ul style="list-style-type: none"> • Hund (Dog Cyt b forward/reverse) • Schaf (Sheep Cyt b forward/reverse)

Zusätzlich konnten Verfahren für den Nachweis des humanen Polyomaviruses (HPyVsF/R) etabliert werden.

5.2.2 Nachweisempfindlichkeit

Ein wichtiger Punkt bei der Interpretation der Daten zum Auftreten von ausgewählten MST-Markern in den Untersuchungsgebieten ist die Empfindlichkeit des Nachweises. Um eine Aussage darüber machen zu können, wurde zum einen die Bestimmungsgrenze anhand des Verhaltens der DNA-Standards bei der Amplifikation festgelegt. Zum anderen wurden Versuche durchgeführt, in denen eine Probe mit einer bekannten Menge an fäkalem Material (Kläranlagen-Zulauf bzw. Hundekot) kontaminiert, anschließend dekadisch verdünnt und geprüft wurde, bis zu welcher Verdünnung die Detektion eines PCR-Signals möglich ist.

Die Bestimmungsgrenze wurde durch die niedrigste DNA-Plasmidkonzentration bestimmt, die ein quantifizierbares Signal erzeugte und im linearen Bereich der Standardkurve lag, wobei die PCR-Effizienz zwischen 90 und 105 % und die R^2 -Werte über 0,980 liegen mussten. Auf diese Weise kann sichergestellt werden, dass die unbekannten Proben in Bezugnahme auf die Standardkurve korrekt quantifiziert werden. Durch den Einsatz verschiedener Standardverdünnungen in die qPCR wurde sichergestellt, dass alle optimierten PCR-Assays eine exakte Quantifizierung über einen sehr großen dynamischen Bereich ermöglichen. Es wurde festgelegt, dass die Bestimmungsgrenze der höchsten Verdünnung entspricht, die im dynamischen Bereich liegt. Die Bestimmungsgrenze lag für die Untersuchungen in den meisten Fällen bei 10 Kopien/Reaktion. Unter Berücksichtigung der Anreicherung, DNA-Extraktion und PCR-Analyse ergibt sich für die Untersuchungen im Einzugsgebietsmaßstab eine Bestimmungsgrenze von 4 Kopien/mL Probe und für die Batch-Versuche zur Stabilität von 67 Kopien/mL Probe. Der Unterschied ist in den

verschiedenen Ausgangsvolumina (1 L für Umweltproben und 15 mL für die Batch-Versuche) begründet.

Der Probenaufbereitung auf die Empfindlichkeit des Nachweises, d. h. wie stark verdünnt die Kontamination vorliegen kann, um mit dem festgelegten Protokoll noch nachweisbar zu sein, wurde durch die Herstellung von Verdünnungsreihen von Abwasser in Leitungswasser erfasst. Hierzu wurden die Eintragsquellen untersucht, die sich bei den Untersuchungen im Einzugsgebietsmaßstab als relevant herausstellten. Deshalb lag der Fokus auf der Erfassung der Nachweisempfindlichkeit von fäkalen Einträgen durch Hunde und kommunales Abwasser. Die Ergebnisse der Verdünnungsversuche sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengefasst.

Tabelle 5.5: Ergebnisse der Untersuchung zur Nachweisempfindlichkeit mit humanem Abwasser.

Verdünnung	Abwasser/ Probe	Filtrations- volumen	Konzentration <i>Bacteroides</i> -Marker	Konzentration mtDNA Marker
10 ⁻²	10 mL/L	10 mL	136.950 Kopien/mL	1.220 Kopien/mL
10 ⁻⁴	0,1 mL/L	10 mL	1.020 Kopien/mL	-
10 ⁻⁶	0,001 mL/L	10 mL	11,2 Kopien/mL	-
10 ⁻⁸	0,0001 mL/L	10 mL	-	-

Tabelle 5.6: Ergebnisse der Untersuchung zur Nachweisempfindlichkeit mit Hundekot.

Verdünnung	Hundekot/ Probe	Filtrations- volumen	Konzentration <i>Bacteroides</i> -Marker	Konzentration mtDNA Marker
10 ⁻²	100 mg/L	10 mL	26.190 Kopien/mL	2.200 Kopien/mL
10 ⁻⁴	1 mg/L	10 mL	143 Kopien/mL	-
10 ⁻⁶	0,1 mg/L	10 mL	-	-

Für die Laboruntersuchungen zur Nachweisempfindlichkeit wurde ein Probenvolumen von 10 mL filtriert. Bei einer 10⁻⁶ Verdünnung konnten noch 11,2 Kopien/mL des wirtsunspezifischen *Bacteroides*-Markers nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung von Feldproben wird ein Volumen von 1000 mL über Membranfiltration angereichert. Allerdings werden hierbei auch Stoffe wie Humin- und Fulvinsäuren aufkonzentriert. Diese Substanzen werden häufig bei der DNA-Isolierung nicht vollständig entfernt und führen zu einer Inhibierung der Amplifikationsreaktion und haben damit einen negativen Einfluss auf die Nachweisempfindlichkeit. Unter Berücksichtigung dieser Fakten und unter der Annahme, dass die gleiche Kotmenge in 1 L und nicht in 10 mL vorlag, kann davon ausgegangen werden, dass unter Einsatz des *Bacteroides*-basierten Markers der Nachweis von 0,0001 mL Abwasser in 1 L Wasser möglich ist. D. h. man kann 1 mL Abwasser in 10.000 L Probe detektieren. Nutzt man mtDNA-basierte Marker so ist der Nachweis von 1 mL in 100 L Probe möglich. Für die Untersuchungen mit Hundekot ergab sich eine Nachweisempfindlichkeit von 1 g frischem Hundekot in 10.000 L Probe unter Verwendung des *Bacteroides*-basierten Markers und 1 g in 100 L Probe für den mtDNA-basierten Marker.

Die Validierung von MST-Markern erfolgt durch die Bewertung bestimmter Leistungskriterien wie Nachweisempfindlichkeit, Sensitivität und Spezifität (Scott et al., 2005; Stoeckel und Harwood, 2007; Ufnar et al., 2006). Sensitivität bezieht sich auf den Anteil bekannter positiver Proben, die

korrekt als positiv (echt positive Rate) identifiziert werden. Die Empfindlichkeit einer Methode kann durch physikalische oder chemische Eigenschaften der Matrix oder des Probenotyps (z. B. Inhibitoren wie Huminsäuren) beeinflusst werden (Haugland et al., 2005; Siefing et al., 2008). Daher wird die Empfindlichkeit einer Methode am genauesten in einer neutralen Matrix bewertet, d. h. durch Zugabe von Fäkalien oder Abwasser zu einer Pufferlösung oder Leitungswasser (Harwood et al., 2009). Da die Sensitivität aufgrund der geografischen Variabilität der Verteilung des Markers in der menschlichen Bevölkerung variieren kann, wird die Sensitivität oft über einen geografischen Bereich hinweg bestimmt und sollte immer in einer neuen geografischen Region verifiziert werden (Harwood et al., 2009; Scott et al., 2005; Stoeckel und Harwood, 2007; Ufnar et al., 2006).

Es wurden viele qPCR-Methoden entwickelt, die auf das 16S rRNA-Gen humanassoziierter *Bacteroidales* abzielen (Farnleitner et al., 2005; Kildare et al., 2007; Layton et al., 2006; Lee et al., 2010; Okabe et al., 2007; Reischer et al., 2007; Seurinck et al., 2005). Einige dieser Primer überlappen in einer kurzen 600-bp-Region, auf die die meisten Assays abzielen. Aus der variierenden Lokalisierung der Primer und Sonden könnten Unterschiede in der Empfindlichkeit der Test resultieren. Eine der ersten Datenbank-unabhängigen Methoden, die für den Nachweis von humanen Kontaminationen entwickelt wurden, ist der Endpunkt-PCR-Nachweis mit dem HF183-Primer (Bernhard und Field, 2000a). Seurinck et al. (2005) etablierten eine qPCR-Methode, die auf SYBR®-Green-Chemie basiert, unter Verwendung des HF183-Primers und eines neuen reversen Primers. Die Methode erwies sich als sehr sensitiv und wurde auch für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit genutzt. In den Untersuchungen von Seurinck et al. (2005) lag der lineare Bereich der qPCR-Standkurven zwischen $1,4 \cdot 10^7$ und $1,4 \cdot 10^2$ Genkopien pro μL DNA-Extrakt. Geringere Konzentrationen des Markers wurden getestet, aber die Amplifikation und der Nachweis waren nicht reproduzierbar. Dies wurde durch die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt. Hier konnten auch 10^1 Genkopien pro Reaktion noch reproduzierbar erfasst werden. Dieser Unterschied könnte z. B. in den verwendeten PCR-Reagenzien begründet sein. Nichtsdestotrotz konnten Seurinck et al. (2005) mit ihrem Assay 1 ng Fäzes (Nassgewicht) in 1 L Wasser nachweisen. Ein Vergleich des Wertes mit den Ergebnissen dieser Arbeit ist schwierig, da unterschiedliche Ausgangsproben (humanes Abwasser und Fäzes) eingesetzt wurden. Geht man davon aus, dass durchschnittlich 128 g Fäkalien pro Kopf und Tag ausgeschieden werden (Rose et al., 2015), kann anhand der Kenndaten der Kläranlage (Einwohnerwert: 875.000; Zulauf bei Trockenwetter: 64.000 m³ pro Tag) das zugegebenen Nassgewichtes an Kot in meinen Versuchen näherungsweise berechnet werden. Mit einer Nachweisempfindlichkeit von 175 ng Fäzes in 1 L Wasser ist der Nachweis etwas unempfindlicher als bei Seurinck et al. (2005).

Neben der SYBR®-Green-Chemie sind in der Literatur auch TaqMan-qPCR-Methoden beschrieben, die auf die gleichen Genabschnitte abzielen wie der Assay von Seurinck et al. (Kildare et al., 2007). In dieser Studie wurde auch die BacHum-UCD-Methode mit bestehenden qPCR-Methoden verglichen, wobei festgestellt wurde, dass die SYBR Green-HF183 qPCR-Methode etwa 10-fach empfindlicher war als BacHum-UCD-Assay (Kildare et al., 2007).

Der Hunde-spezifische Marker DF475 wurde von Dick et al. (2005b) entwickelt. Es wurde eine subtraktive Hybridisierung durchgeführt, um wirtsspezifische fäkale *Bacteroidales* 16S rRNA

Genfragmente zu identifizieren, die sich von denen sehr nah verwandter Wirtsquellen unterscheiden. Zielsequenzen, die nicht durch Hybridisierung immobilisiert werden konnten, wurden kloniert und sequenziert und entsprechende Primer wurden entworfen. Die neuen wirtsspezifischen Primer, die aus subtrahierten Zielfragmenten konstruiert wurden, differenzierten gut zwischen sehr nah verwandten *Bacteroidales*-rRNA-Gensequenzen und ähnlichen fäkalen Quellen. Obwohl dieser Hunde-spezifische PCR-Assay bereits für Feldstudien eingesetzt wurde (Griffith et al., 2013; Rothenheber und Jones, 2018; Tezak, 2009), wurden bislang keine Studien zur Empfindlichkeit des Assays publiziert.

Auch mtDNA kann zu MST-Zwecken genutzt werden. Die eingesetzten Primer für den Nachweis humaner mtDNA wurden von Kortbaoui et al. (2009) entworfen und sowohl für die Etablierung einer Multiplex-Nested-PCR-Methode als auch einer Verfahrenskombination aus PCR und Dot-Blot-Hybridisierung genutzt. Auch in anderen Studien wurden die Primer nicht für real-time PCR-Analysen genutzt. Für die Etablierung des qPCR-Assays mit humanspezifischen mtDNA-Primer wurden Konzentrationen von 10^1 bis 10^8 Kopien des entsprechenden Gens pro μL eingesetzt (Schill und Mathes, 2008). Es konnte eine gute Linearität der Standardkurve über den gesamten Konzentrationsbereich beobachtet werden (Schill und Mathes, 2008). Die Erfassung von mtDNA in kommunalem Abwasser ergab eine durchschnittliche Konzentration von $7,2 \cdot 10^2$ pro mL (Schill und Mathes, 2008). Dieser Wert liegt auf dem gleichen Niveau wie die ermittelten Konzentrationen in dieser Arbeit (siehe Tabelle 5.9).

5.2.3 Spezifität und Sensitivität der Marker

Die Spezifität und Sensitivität eines Markers wird im Allgemeinen durch die Analyse von Stuhl- und/oder Abwasserproben von verschiedenen Ausscheidern ermittelt (Stoeckel und Harwood, 2007). Obwohl DNA-Sequenzen, die Kandidaten für MST-Marker sind, eine vorläufige in-silico-Spezifitätsbeurteilung (d. h. eine computergenerierte BLAST-Suche gegen die NCBI-Datenbank von Sequenzen) durchlaufen, sollte eine zusätzliche Bewertung der Spezifität und Sensitivität mit Realproben durchgeführt werden. Spezifitätstests können mit einzelnen Stuhlproben oder Mischproben durchgeführt werden. Als Mischproben wurden einerseits künstlich hergestellte Proben genutzt, die aus dem Fäzes verschiedener Realproben bestehen. Andererseits wurden auch Realproben eingesetzt, bei denen der Ursprung der mikrobiellen Belastung belegt ist (z. B. Abwasser von Hühnerschlachtbetrieben). Ein Vorteil von Mischproben ist, dass sie, solange ihre Untersuchung keine positiven Befunde liefert, das Testen einer größeren Anzahl von Individuen mit einem geringeren Umfang an Analysen erlauben. Außerdem sind die Ergebnisse statistisch abgesicherter. Allerdings sind bei falsch-positiven Signalen keine Rückschlüsse darauf möglich, wie viele individuelle Signale zu diesen Ergebnissen beigetragen haben. Außerdem könnten durch das Mischen der Proben und einer damit einhergehenden Verdünnung einzelner Proben individuelle Positivsignale übersehen werden. Im Fall von fäkalen Einträgen durch den Mensch wird dringend die Untersuchung von lokalen Abwasserproben und Proben aus dem Behandlungs- und Entsorgungssystem empfohlen, da diese Mischproben den Wasserkörper mit einer höheren Wahrscheinlichkeit kontaminieren als die Ausscheidungen einzelner Individuen (Gordon et al., 2002).

Für die Nachweissysteme, die für Untersuchungen im Einzugsgebietsmaßstab genutzt wurden, wurde die Spezifität und Sensitivität ermittelt. Hierzu wurden 48 Mischproben auf das Vorkommen von zwölf verschiedenen MST-Markern analysiert. Die Daten wurden hinsichtlich des Vorhandenseins eines Signales (positiv/negativ) ausgewertet. Eine ausführliche Auflistung ist im Anhang (Tabelle 10.10 und 10.11) zu finden. Ausgehend von den Ergebnissen wurde die Spezifität S und Sensitivität R anhand folgender Formeln (Ballesté et al., 2010) ermittelt:

$$R = \frac{RP}{(RP + FN)}$$

Formel 5.1: Berechnung der Sensitivität

$$S = \frac{RN}{(FP + RN)}$$

Formel 5.2: Berechnung der Spezifität

wobei RP die richtig positiven Ergebnisse,
FN die falsch negativen Ergebnisse,
RN die richtig negativen Ergebnisse und
FP die falsch positiven Ergebnisse bezeichnet.

Tabelle 5.7: Ergebnisse der Untersuchung zur Spezifität und Sensitivität der *Bacteroides*-basierten Marker.

Marker	Sensitivität	Spezifität
Wiederkäuer – BacR_f/_r	100 %	73,3 %
Schwein – Pig2 Bac 41 F/163 R	85,7 %	93,3 %
Hund – DF 475 F/Bac708R	100 %	88,2 %

Tabelle 5.8: Ergebnisse der Untersuchung zur Spezifität und Sensitivität der mitochondrialen DNA-Sequenzen.

Marker	Sensitivität	Spezifität
Mensch – Human Cyt b forward/reverse	100 %	93,3 %
Rind – Cow Cyt b forward/reverse	100 %	100 %
Hund – Dog Cyt b forward/reverse	100 %	94,1 %
Huhn – Chicken Cyt b forward/reverse	100 %	100 %
Pferd – Horse Cyt b forward/reverse	100 %	100 %
Schaf – Sheep Cyt b forward/reverse	100 %	98,0 %

Insgesamt zeigten die Untersuchungen, dass alle eingesetzten PCR-Assays eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweisen. Grundsätzlich zeichnen sich die mtDNA-basierten Marker durch eine noch höhere Spezifität und Sensitivität aus als die *Bacteroides*-basierten Marker (Baker-Austin et al., 2009; Baker-Austin et al., 2010; Kortbaoui et al., 2009). Ein Nachteil der mtDNA-Marker ist aber, dass ihre Anwendung aufgrund des relativ geringen Ausscheidens durch den Wirt eingeschränkt ist. Im Durchschnitt waren die Werte für den Art-unspezifischen mtDNA-Marker um über 3 Log-Stufen geringer als die Werte für die wirtsunspezifischen *Bacteroides*-Marker.

Der humanassoziierte *Bacteroides*-Marker HF183 wurde aufgrund seiner Wirtsspezifität und Sensitivität bereits in zahlreichen Studien zur Bewertung der Abwasserbelastung von Gewässern eingesetzt (Hagedorn et al., 2011). Die Spezifität von HF183 gegenüber humanen Fäkalverunreinigungen lag in verschiedensten Studien bei etwa 97 % (Harwood et al., 2014) und die Sensitivität bei 100 % (Harwood et al., 2014). Die quantitative PCR-Technologie entwickelt sich rasch weiter und führt zu einer Verbesserung der Leistungsfähigkeit der Datenbank-unabhängigen MST-Verfahren (Shanks et al., 2016). In den letzten Jahren wurde die Spezifität und Sensitivität des HF183-Assays durch die Einführung alternativer reverser Primer und komplementärer Sonden weiter optimiert (Green et al., 2014; Hagedorn et al., 2011; Seurinck et al., 2005). Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen eine Spezifität von 99,3 % für diesen Assay hinsichtlich der Untersuchungen in Deutschland. Damit erwies sich der HF183 als sehr spezifischer und empfindlicher Marker zur Identifizierung humaner Einträge. Dies gilt auch für die Spezifitäten und Sensitivitäten der anderen wirtsspezifischen Marker (siehe nachfolgende Tabelle).

Tabelle 5.9: Ergebnisse der Untersuchung zur Spezifität und Sensitivität im Rahmen anderer Studien.

Assay	Referenz	Sensitivität	Spezifität		
Bacteroides-basierte Verfahren					
Mensch HF183/BacHum-241r	Seurinck et al., 2005	100 %	95 %		
	Kildare et al., 2007	100 %	95 %		
	Ahmed et al., 2009a	100 %	99 %		
	Ahmed et al., 2010b	87 %	93 %		
	Shanks et al., 2010	100 %	91 %		
	Symonds et al., 2016	100 %	94 %		
Wiederkäuer BacR_f/_r	Reischer et al., 2006	100 %	100 %		
	Mieszkin et al., 2009	100 %	89 %		
	Raith et al., 2013,	100 %	85-100 %		
Schwein Pig2 Bac 41 F/163 R	He et al., 2016;	100 %	100 %		
	Mieszkin et al., 2009	100 %	100 %		
Hund DF 475 F/Bac708R	Symonds et al., 2016	75 %	68 %		
mtDNA-basierte Verfahren					
Mensch					
Human Cyt b forward/reverse	keine Information verfügbar				
Rind					
Cow Cyt b forward/reverse					
Hund					
Dog Cyt b forward/reverse					
Huhn Chicken Cyt b forward/reverse	Schill und Mathes, 2008	durchschnittlich 85 %	durchschnittlich 99 %		
Pferd					
Horse Cyt b forward/reverse					
Schaf					
Sheep Cyt b forward/reverse					

5.2.4 Charakterisierung möglicher Eintragsquellen

Die Eigenschaften von fäkalen Eintragsquellen und die Art und Weise, wie sie erfasst werden, können die Interpretation grundlegend beeinflussen. Obwohl bekannt ist, dass Fäkalien verschiedener Ausscheider sich in ihrer Masse und Zusammensetzung unterscheiden, ist bislang wenig über diese Unterschiede bekannt. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit Abwasserproben von unterschiedlichen Ausscheidern (Mensch, Rind, Schwein, Huhn und Pferd)

auf Indikatorbakterien und MST-Marker untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.10 aufgelistet.

Tabelle 5.10: Analyseergebnisse der Untersuchungen zur Charakterisierung von Eintragsquellen (Abwasser).

Aus-scheider	Jahreszeit	<i>E. coli</i>	Entero-kokken	<i>C. perfringens</i> Sporen	Wirtsun- spezifischer <i>Bacteroides</i> - Marker	Art- unspezifischer mtDNA-Marker
		pro 10 mL				
Mensch	Herbst	$6,2 \cdot 10^5$	$9,6 \cdot 10^4$	$3,3 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^{10}$	$1,2 \cdot 10^6$
	Winter	$6,6 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^5$	$3,6 \cdot 10^4$	$5,7 \cdot 10^9$	$1,9 \cdot 10^6$
	Sommer	$9,5 \cdot 10^5$	$4,7 \cdot 10^4$	$2,9 \cdot 10^4$	$3,5 \cdot 10^9$	$2,7 \cdot 10^6$
	Sommer	$1,5 \cdot 10^6$	$3,3 \cdot 10^5$	$6,0 \cdot 10^3$	$5,4 \cdot 10^9$	$5,5 \cdot 10^5$
	Frühling	$1,6 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^5$	$3,1 \cdot 10^4$	$5,5 \cdot 10^9$	$5,6 \cdot 10^5$
Schwein	Herbst	$1,9 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^4$	$<1,0 \cdot 10^1$	$1,5 \cdot 10^{10}$	$1,0 \cdot 10^5$
	Winter	$1,1 \cdot 10^6$	$1,9 \cdot 10^5$	$<1,0 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^{10}$	$4,6 \cdot 10^5$
	Sommer	$6,9 \cdot 10^5$	$4,0 \cdot 10^6$	$6,7 \cdot 10^2$	$1,4 \cdot 10^{10}$	$6,0 \cdot 10^5$
	Sommer	$2,1 \cdot 10^6$	$8,0 \cdot 10^6$	$3,8 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^{10}$	$2,8 \cdot 10^5$
Rind	Winter	$4,6 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^5$	$3,9 \cdot 10^1$	$4,6 \cdot 10^{11}$	$6,6 \cdot 10^8$
	Sommer	$1,4 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^1$	$4,8 \cdot 10^{10}$	$8,1 \cdot 10^7$
	Sommer	$9,8 \cdot 10^5$	$6,7 \cdot 10^6$	$<1,0 \cdot 10^2$	$2,7 \cdot 10^{10}$	$3,2 \cdot 10^7$
	Frühling	$3,0 \cdot 10^3$	$8,5 \cdot 10^6$	$<1,0 \cdot 10^1$	$9,3 \cdot 10^9$	$3,4 \cdot 10^7$
Huhn	Herbst	$1,1 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^6$	$<1,0 \cdot 10^1$	$6,6 \cdot 10^{10}$	$1,6 \cdot 10^8$
	Winter	$2,1 \cdot 10^7$	$4,6 \cdot 10^5$	$8,9 \cdot 10^3$	$2,2 \cdot 10^{10}$	$1,9 \cdot 10^7$
	Sommer	$1,4 \cdot 10^5$	$3,2 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^{11}$	$7,7 \cdot 10^7$
	Sommer	$1,8 \cdot 10^7$	$1,0 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^2$	$2,9 \cdot 10^{10}$	$7,1 \cdot 10^7$
	Frühling	$1,4 \cdot 10^8$	$8,6 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^2$	$1,1 \cdot 10^{10}$	$2,2 \cdot 10^7$
Pferd	Herbst	$2,8 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^5$	$2,5 \cdot 10^0$	$8,7 \cdot 10^9$	$8,0 \cdot 10^5$
	Winter	$9,0 \cdot 10^4$	$3,5 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$	$1,1 \cdot 10^9$	$2,0 \cdot 10^4$
	Sommer	$6,0 \cdot 10^3$	$2,2 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^1$	$1,3 \cdot 10^{10}$	$4,0 \cdot 10^5$
	Sommer	$3,7 \cdot 10^5$	$3,3 \cdot 10^4$	$<1,0 \cdot 10^1$	$8,3 \cdot 10^9$	$9,0 \cdot 10^5$
	Frühling	$1,6 \cdot 10^6$	$7,1 \cdot 10^5$	$<1,0 \cdot 10^0$	$3,5 \cdot 10^9$	$1,5 \cdot 10^5$

In den Abwasserproben aller Ausscheider konnten Indikatorbakterien und MST-Marker in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden. Die Kopienzahlen für die *Bacteroides*-basierten Marker liegen über den Koloniezahlen für die *E. coli*-Bakterien, die mtDNA-basierten Marker sind in etwa auf dem gleichen Niveau wie *E. coli*. Insgesamt sind keine signifikanten Unterschiede in den Konzentrationen sowohl zwischen den verschiedenen Jahreszeiten, als auch im Vergleich von Proben verschiedener Ausscheider zu erkennen. Am stärksten schwanken die Konzentrationen der *C. perfringens*-Sporen.

Betrachtet man das Verhältnis von Marker und *E. coli* (Tabelle 5.11) erhält man für den *Bacteroides*-Marker einen Median von $1,3 \cdot 10^4$ und für den mtDNA-Marker von $2,4 \cdot 10^0$ Kopien/KBE. Die Werte liegen zwischen $8,1 \cdot 10^1$ und $9,9 \cdot 10^6$ bzw. $5,3 \cdot 10^{-3}$ und $1,4 \cdot 10^4$ Kopien/KBE und weisen damit eine breite Streuung auf.

Tabelle 5.11: Verhältnis Indikatorbakterien und Microbial Source Tracking-Marker zu *E. coli* in frischen Kotproben (n.b. = nicht bestimmbar).

Aus-scheider	Jahreszeit	Enterokokken	<i>C. perfringens</i> Sporen	Wirtsun-spezifischer <i>Bacteroides</i> -Marker	Art-unspezifischer mtDNA-Marker
<i>/ E. coli</i>					
Mensch	Herbst	$1,5 \cdot 10^{-1}$	$5,3 \cdot 10^{-2}$	$1,6 \cdot 10^4$	$1,9 \cdot 10^0$
	Winter	$2,3 \cdot 10^{-1}$	$5,5 \cdot 10^{-2}$	$8,6 \cdot 10^3$	$2,9 \cdot 10^0$
	Sommer	$4,9 \cdot 10^{-2}$	$3,1 \cdot 10^{-2}$	$3,7 \cdot 10^3$	$2,8 \cdot 10^0$
	Sommer	$2,2 \cdot 10^{-1}$	$4,0 \cdot 10^{-3}$	$3,6 \cdot 10^3$	$3,7 \cdot 10^{-1}$
	Frühling	$1,4 \cdot 10^0$	$1,9 \cdot 10^{-1}$	$3,5 \cdot 10^4$	$3,5 \cdot 10^0$
Schwein	Herbst	$1,1 \cdot 10^{-3}$	n.b.	$7,8 \cdot 10^2$	$5,3 \cdot 10^{-3}$
	Winter	$1,7 \cdot 10^{-1}$	n.b.	$9,9 \cdot 10^3$	$4,2 \cdot 10^{-1}$
	Sommer	$5,8 \cdot 10^0$	$9,7 \cdot 10^{-4}$	$2,1 \cdot 10^4$	$8,7 \cdot 10^{-1}$
	Sommer	$3,8 \cdot 10^0$	$1,8 \cdot 10^{-1}$	$4,8 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^{-1}$
Rind	Winter	$2,4 \cdot 10^0$	$8,5 \cdot 10^{-4}$	$9,9 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^4$
	Sommer	$1,0 \cdot 10^{-1}$	$1,4 \cdot 10^{-5}$	$3,4 \cdot 10^4$	$5,8 \cdot 10^1$
	Sommer	$6,8 \cdot 10^0$	n.b.	$2,8 \cdot 10^4$	$3,3 \cdot 10^1$
	Frühling	$2,8 \cdot 10^0$	n.b.	$3,1 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^4$
Huhn	Herbst	$1,4 \cdot 10^{-1}$	n.b.	$6,0 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^1$
	Winter	$2,2 \cdot 10^{-2}$	$4,2 \cdot 10^{-4}$	$1,0 \cdot 10^3$	$9,1 \cdot 10^{-1}$
	Sommer	$2,3 \cdot 10^0$	$1,1 \cdot 10^{-2}$	$1,2 \cdot 10^6$	$5,5 \cdot 10^2$
	Sommer	$5,6 \cdot 10^{-2}$	$6,1 \cdot 10^{-6}$	$1,6 \cdot 10^3$	$3,9 \cdot 10^0$
	Frühling	$6,1 \cdot 10^{-2}$	$1,8 \cdot 10^{-6}$	$8,1 \cdot 10^1$	$1,6 \cdot 10^{-1}$
Pferd	Herbst	$8,9 \cdot 10^0$	$8,9 \cdot 10^{-5}$	$3,1 \cdot 10^5$	$2,9 \cdot 10^1$
	Winter	$3,9 \cdot 10^{-3}$	n.b.	$1,3 \cdot 10^4$	$2,2 \cdot 10^{-1}$
	Sommer	$3,7 \cdot 10^0$	n.b.	$2,2 \cdot 10^6$	$6,7 \cdot 10^1$
	Sommer	$8,9 \cdot 10^2$	n.b.	$2,2 \cdot 10^4$	$2,4 \cdot 10^0$
	Frühling	$4,4 \cdot 10^{-1}$	n.b.	$2,2 \cdot 10^3$	$9,4 \cdot 10^{-2}$

Viele Studien belegen, dass *Bacteroides* spp. und *Bifidobacterium* spp. im Vergleich zu *Clostridium* spp., Enterokokken, *E. coli* und anderen Coliformen in menschlichen Fäkalien typischerweise in höheren Mengen vorhanden sind (Harwood et al., 2018). Während im Stuhl von gesunden Menschen die Konzentration der *Bacteroides*-Bakterien bei durchschnittlich 11,3 Log KBE pro g Fäzes liegt, wurden für *E. coli* und Enterokokken Werte im Bereich von 7,5-7,7 bzw. 3,5-7,2 Log KBE pro g Fäzes ermittelt (Cabral, 2010). Bildet man das Verhältnis von *Bacteroides* zu *E. coli* bzw. Enterokokken zu *E. coli*, so werden die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt. Die Konzentration der fäkalen Indikatorbakterien in menschlichen Fäkalien sind unter den Individuen sehr variabel und können aufgrund verschiedener Faktoren, wie z. B. Ernährung oder gesundheitlicher Zustand, variieren (Harwood et al., 2018).

Abwasser enthält menschliche Ausscheidungen, die mit Toilettenspülwasser verdünnt werden. In Deutschland tragen u. a. auch Bade- und Duschwasser, Abläufe von Waschmaschinen, Kühlwässer aus der Industrie zur Verdünnung der Ausscheidungen bei.

Aus diesem Grund können die relativen Konzentrationen der Indikatorbakterien im Abwasser stark zeitlich und regional variieren. In einer amerikanischen Studie zu einem Abwasser, das vor allem aus häuslichem Abwasser bestand, lag die Konzentration der coliformen Bakterien im Mittel bei $3,3 \cdot 10^7$ und der Enterokokken bei $9,4 \cdot 10^5$ KBE pro 100 mL (Harwood et al., 2005). *C. perfringens* wurde nur sporadisch nachgewiesen, wobei die Werte zwei oder mehr Log-Stufen niedriger lagen als die Coliformen-Werte (Harwood et al., 2005). Über die Konzentration von obligaten anaeroben Fäkalbakterien wie *Bacteroides* und *Bifidobacterium* spp. sind nur wenige Studien veröffentlicht. In einer Studie von Ottoson (2009) lag die Konzentration von *Bifidobacterium* spp. in unbehandeltem Abwasser (basierend auf der Kultivierung auf HBSA-Medium) bei $4,0 \cdot 10^6$ CFU pro 100 mL.

5.2.5 Stabilität von Microbial Source Tracking-Markern

Um Informationen über die Stabilität von MST-Markern zu erhalten und eventuell Aussagen über das Alter einer Kontamination machen zu können, wurde die Stabilität von Indikatorbakterien und MST-Markern unter verschiedenen Bedingungen erfasst. Hierzu wurden Batch-Experimente durchgeführt.

Bei jeder Probennahme wurden die Sofortparameter pH, Sauerstoffgehalt und Temperatur bestimmt. Die pH-Werte am Start-Tag lagen etwas über dem neutralen Bereich bei 7,8 und 8,0. Nach dem ersten Tag stellten sich sowohl in den aeroben als auch in den anaeroben Ansätzen konstante pH-Werte ein. Der pH-Wert lagen für die aeroben Ansätze bei $8,6 \pm 0,17$ und für die anaeroben Ansätze bei $7,6 \pm 0,12$.

Der Sauerstoffgehalt lag am Start-Tag zwischen 5 und 6 mg/L. Bei den aeroben Proben erhöhte sich nach Anschluss der Aquarienpumpe der Sauerstoffgehalt auf 6-9 mg/L. Bei den anaeroben Ansätzen lag der Sauerstoffgehalt durchgehend unter 0,2 mg/L. Insgesamt belegen die Messungen das Vorhandensein von aeroben und anaeroben Bedingungen.

Die mittels Kulturverfahren ermittelten Konzentrationen der Bakterien über die Zeit sind im Folgenden dargestellt. Die Nachweisgrenze ist durch ein maximales Untersuchungsvolumen von 10 mL auf 1 Kolonie pro 10 mL festgelegt.

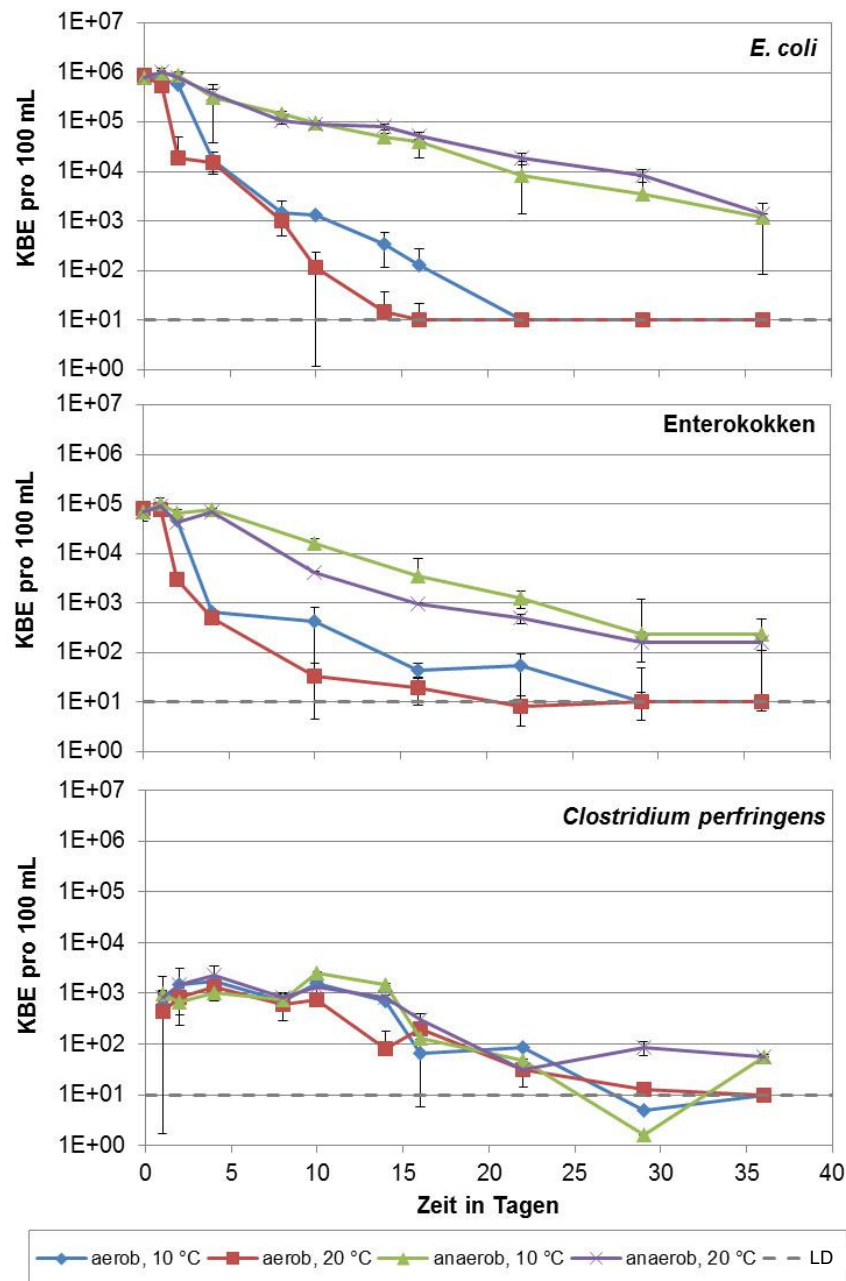


Abbildung 5.4: Verhalten von *E. coli*, Enterokokken und *C. perfringens*-Sporen über die Versuchsdauer (LD = Nachweisgrenze, limit of detection).

Die Startkonzentrationen von *E. coli* lagen bei 10^6 KBE/100 mL. Die Bakterienkonzentration sinkt in den anaeroben Ansätzen langsamer als unter aeroben Bedingungen. Bei den anaeroben Ansätzen scheint die Temperatur nur einen geringen Einfluss auf die Geschwindigkeit des Abbaus zu haben, wohingegen in den aeroben Ansätzen die *E. coli*-Konzentration bei 20 °C schneller abnimmt als bei 10 °C.

Für Enterokokken lag die Anfangskonzentration bei ca. 10^5 KBE/100 mL. Analog zu den *E. coli*-Ergebnissen nimmt die Enterokokken-Zahl unter anaeroben Bedingungen langsamer ab als in den

aeroben Ansätzen. Sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen ist die Abnahme an kultivierbaren Enterokokken bei einer Temperatur von 20 °C stärker ausgeprägt.

Als sporenbildender Organismus wurde auch *C. perfringens* in die Untersuchungen einbezogen. Bereits zu Beginn des Versuches konnten die *C. perfringens*-Sporen in deutlich geringeren Konzentrationen als *E. coli* und Enterokokken nachgewiesen werden. Es wurden die Konzentrationen der Bakteriensporen erfasst. Die Konzentration an Tag 1 lag bei 10^3 KBE/100 mL. Die Konzentrationen der Sporen nahmen bis zum Ende der Versuchszeit um 1-2 Log-Stufen ab.

Parallel zu den Kulturverfahren wurden molekularbiologische Analysen durchgeführt. Da für die Untersuchungen zur Stabilität Kläranlagen-Zulauf als Kontaminationsmaterial verwendet wurde, wurden zum einen wirtsunspezifische und zum anderen die humanspezifischen Nachweismethoden eingesetzt. Die Stabilität von mtDNA- und *Bacteroides*-basierten Systemen wurde vergleichend zu den Indikatorbakterien betrachtet. In den folgenden Abbildungen sind jeweils – nach den Bedingungen sortiert – die Konzentrationen der Marker und die Konzentrationen von *E. coli* dargestellt.

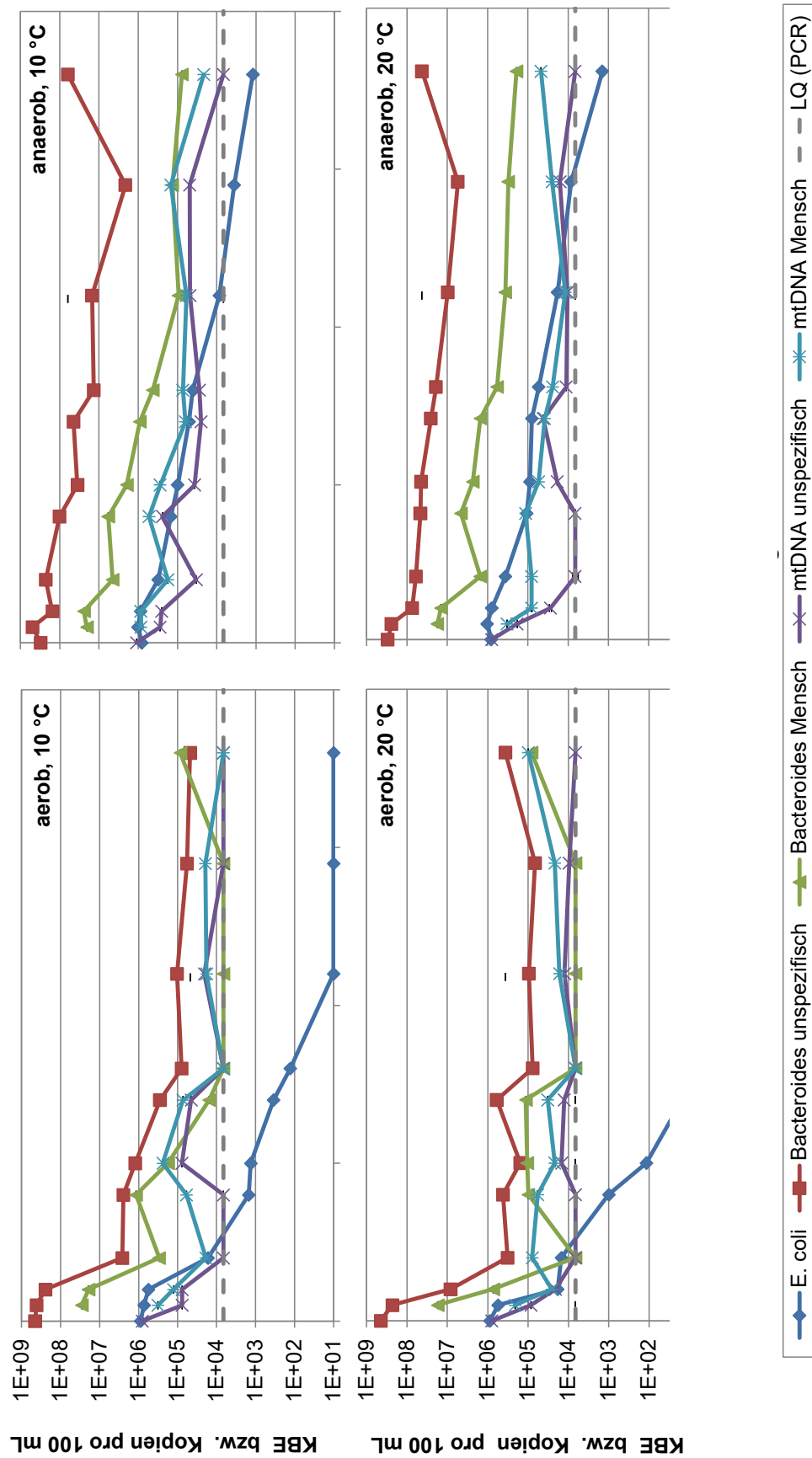


Abbildung 5.5: Übersicht der Ergebnisse zu den Stabilitätsuntersuchungen.

In allen Ansätzen ist insgesamt ein Abwärtstrend des *Bacteroides*-Markers erkennbar. Die aeroben Proben fielen über die Versuchsdauer um 4 Log-Stufen. Die Konzentrationen der anaeroben Proben nahmen hingegen nur um 2 Log-Stufen ab. Die Abnahme der Konzentrationen in den anaeroben Ansätzen bewegte sich über die Versuchsdauer für beide Temperaturen auf dem gleichen Niveau. In den aeroben Ansätzen lagen die Konzentrationen ab Tag 16 unter oder sehr nahe an der LQ. Ebenso wie bei *E. coli* und bei den Enterokokken gibt es deutliche Unterschiede zwischen dem Verhalten der *Bacteroides*-basierten Marker in den aeroben und anaeroben Ansätzen. Die gemessenen Konzentrationen der anaeroben Ansätze lagen zu jeder Zeit über denen der aeroben Ansätze.

Wie zu erwarten lag die Ausgangskonzentration der mtDNA-Marker mit ca. $1,0 \cdot 10^6$ Kopien/100 mL deutlich unter der Konzentration der *Bacteroides*-Marker. Schon nach wenigen Tagen nahmen die Konzentrationen um 1-2 Log-Stufen ab, so dass im folgenden Verlauf die Werte sehr nah bzw. unter dem LQ lagen. Aus diesem Grund sind kaum Unterschiede im Verhalten der Art-unspezifischen mtDNA-Marker bei verschiedenen Versuchsbedingungen zu erkennen.

Um das Verhalten der Marker untereinander und mit dem der Indikatorbakterien besser darstellen und vergleichen zu können, wurden die Abbauraten bestimmt.

Tabelle 5.12: Abbauraten (k), Reduktionzeiten für eine Log-Stufe (T_{90}) und Regressionskoeffizienten (r^2) von *E. coli*, Enterokokken und den genetischen Markern innerhalb 14 Tagen.

		aerob, 10 °C	aerob, 20 °C	anaerob, 10 °C	anaerob, 20 °C
<i>E. coli</i>	k in d ⁻¹	-0,61	-0,73	-0,23	-0,21
	T_{90} in d	3,8	3,2	10,0	11,0
	r^2	0,90	0,94	0,96	0,89
Enterokokken	k in d ⁻¹	-0,57	-0,74	-0,20	-0,33
	T_{90} in d	4,0	3,1	11,5	7,0
	r^2	0,69	0,84	0,91	0,88
<i>Bacteroides</i> wirtsunspezifisch	k in d ⁻¹	-0,53	-0,70	-0,18	-0,13
	T_{90} in d	4,3	3,3	12,8	17,7
	r^2	0,81	0,89	0,80	0,74
<i>Bacteroides</i> Mensch	k in d ⁻¹	-0,47	-0,70	-0,24	-0,19
	T_{90} in d	4,9	3,3	9,6	12,1
	r^2	0,74	0,89	0,84	0,98
mtDNA Art-unspezifisch	k in d ⁻¹	-0,03	-0,11	-0,15	-0,08
	T_{90} in d	76,8	20,9	15,4	28,8
	r^2	0,56	0,61	0,45	0,24
mtDNA Mensch	k in d ⁻¹	-0,05	-0,03	-0,15	-0,06
	T_{90} in d	46,1	76,8	15,4	38,4
	r^2	0,51	0,06	0,52	0,49

In der Umwelt gibt es viele Faktoren, die das Überleben und somit die Stabilität von fäkalen Indikatororganismen und genetischen MST-Markern beeinflussen können. Häufig untersucht ist der Einfluss von Sonnenlicht (Dick et al., 2010; Walters und Field, 2009) und Salzgehalt (Jeanneau et al., 2012; Okabe und Shimazu, 2007). In dieser Arbeit wurden die Ansätze im

Dunkeln inkubiert, um den Faktor Licht und Sonneneinstrahlung ausschließen zu können. Auch der Salzgehalt wurde hier nicht untersucht, da es sich bei den untersuchten Einzugsgebieten um Süßwasserressourcen handelt. Im Fokus dieser Versuche standen die Unterschiede zwischen aeroben und anaeroben Bedingungen mit dem zusätzlichen Faktor Temperatur sowie der Vergleich der Stabilität von Indikatororganismen und genetischen *Bacteroides*-Markern.

E. coli konnte unter aeroben Bedingungen zwei Wochen lang nachgewiesen werden, unter anaeroben Bedingungen sogar bis zum Ende der Versuchsdauer (36 Tage). Trotz der gleichen Start-Konzentrationen sinkt unter Sauerstoffeinfluss Konzentration an kultivierbaren Zellen deutlich schneller. Dies lässt darauf schließen, dass Sauerstoff eine Auswirkung auf die Abbaugeschwindigkeit hat. Dies wurde auch von Roslev et al. (2004) beobachtet, die die Auswirkung von Sauerstoff auf Coliforme, fäkale Enterokokken und somatische Coliphagen untersuchten. Sie ermittelten eine Abbaurate von $-0,31 \text{ d}^{-1}$ unter aeroben Bedingungen und $-0,02 \text{ d}^{-1}$ unter Sauerstoffausschluss. Diese Werte liegen deutlich unter den Abbauraten dieser Versuche. Allerdings führten Roslev et al. die Untersuchungen mit einer *E. coli*-Reinkultur in reinem Trinkwasser durch.

Jeanneau et al. (2012) verglichen das Überleben fäkaler Indikatorbakterien und human-spezifischer Marker in Meer- und Süßwasser. Sie führten ihre Experimente unter aeroben Bedingungen im Dunkeln und bei 20°C durch. Die Abbaurate von kultivierbaren *E. coli* betrug $-0,41 \pm 0,02$ und liegt damit in einem niedrigeren Bereich als in der vorliegenden Arbeit. Die Unterschiede in den Abbauraten für *E. coli* könnten im Versuchsaufbau begründet sein.

Zum Verhalten und der Stabilität von Enterokokken in aquatischen Ökosystemen gibt es deutlich weniger Veröffentlichungen als beispielsweise für *E. coli*. Bekannt ist, dass Enterokokken in geringeren Konzentrationen pro g Fäkalien (1-3 Log-Stufen) vorkommen als *E. coli* (Cabral, 2010; Edberg et al., 2000). Dies zeigen auch die Ausgangskonzentrationen in den Batchversuchen. Allgemein wird davon ausgegangen, dass Enterokokken länger in der Umwelt persistieren können als *E. coli* (Byappanahalli et al., 2012). Dies konnten die durchgeführten Versuche nicht bestätigen. Hier stimmten die Abbauraten für *E. coli* und Enterokokken nahezu überein. Auch für die Enterokokken konnte eine schnelle Reduktion unter anaeroben Bedingungen beobachtet werden. Enterokokken werden aufgrund ihrer hohen Salztoleranz, aber hauptsächlich bei Untersuchungen von Meerwasserproben eingesetzt (Edberg et al., 2000). Da *E. coli* meist in höheren Konzentrationen vorliegt als Enterokokken, wurden für diese Arbeit vor allem die Ergebnisse dieses Indikatorbakteriums für den Vergleich mit den genetischen Markern herangezogen.

Eine Arbeit aus dem Jahr 2007 (Savichtcheva et al., 2007) bezieht auch *C. perfringens* in den Vergleich mit *Bacteroides*-Markern mit ein. Allerdings konnte keine Korrelation mit dem allgemeinen und humanspezifischen *Bacteroides*-Marker festgestellt werden. In den durchgeführten Batchversuchen wurde nur das Auftreten der *C. perfringens*-Sporen erfasst. Insgesamt wurde eine Abnahme der Sporen über die Versuchsdauer beobachtet. Sporen sind deutlich langlebiger als beispielsweise *E. coli*-Bakterien und Enterokokken (Edberg et al., 2000). Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen der Batchversuche wider.

Im Allgemeinen gilt der Kulturnachweis von *Bacteroides* als Indikator einer frischen fäkalen Kontamination, da diese sich schneller abbauen als die klassischen Fäkalindikatoren (Ballesté

und Blanch, 2010). Die genetischen Marker allerdings halten sich länger als die lebenden Zellen. Dies rührt vor allem daher, dass auch die DNA toter Zellen nachgewiesen wird (Walters und Field, 2009). Okabe und Shimazu (2007) stellten bei ihren Versuchen fest, dass der Abbau der *Bacteroides*-Marker in ihren Ansätzen bei 10 °C erst nach Tag 4 einsetzte. Außerdem fanden sie heraus, dass der Abbau der genetischen Marker bei 20 °C schneller von statten geht als bei 10 °C. Diese Befunde wurden durch die Ergebnisse der Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit bestätigt. Liang et al. (2012) konnten den humanspezifischen Marker (HF183) unter aeroben Bedingungen nur 14 Tage nachweisen. Dies stimmt mit den Ergebnissen der aeroben Ansätze im Rahmen dieser Arbeit überein. In dieser Studie wurden für den Abbau innerhalb von 14 Tagen eine von -0,70/Tag (aerob, 20 °C) ermittelt. Liang et al. kalkulierten eine Rate von -0,73/Tag für den Abbau des humanspezifischen *Bacteroides*-Markers. Auch Dick et al. (2010) führten Versuche zum Abbau von MST-Markern unter verschiedenen Bedingungen durch. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden zwei unterschiedliche humane *Bacteroides*-basierte Marker und ein wirtsunspezifischer *Bacteroides*-Marker untersucht. Insgesamt zeigten die Ergebnisse, dass die Abbauraten der Marker sich deutlich unterschieden und aus diesem Grund nicht übertragbar sind. Dies zeigt die Wichtigkeit von Versuchen zur Stabilität für die im Rahmen dieser Arbeit genutzten Marker.

Über das Verhalten und den Abbau der mtDNA in der Umwelt ist bisher kaum etwas bekannt. Allerdings wird mtDNA eine hohe Spezifität und Stabilität nachgesagt (Caldwell et al., 2011). Eine Auswertung der mtDNA-Ergebnisse im Rahmen der durchgeführten Versuche gestaltet sich schwierig, da die Konzentrationen ab dem zweiten Tag unter oder sehr nahe am LQ lagen. Dies spiegelt sich auch in den niedrigen Werten der Regressionskoeffizienten wider.

Für die Interpretation von Daten aus den Feldanalysen war es wichtig zu prüfen, ob ein Zusammenhang zwischen den Abbauraten der Indikatorbakterien und MST-Marker besteht. Aus diesem Grund wurde der Abbau von *E. coli*-Bakterien, die mittels Kulturverfahren nachgewiesen wurden, und MST-Markern (PCR-basierte Verfahren) im Verhältnis zueinander betrachtet.

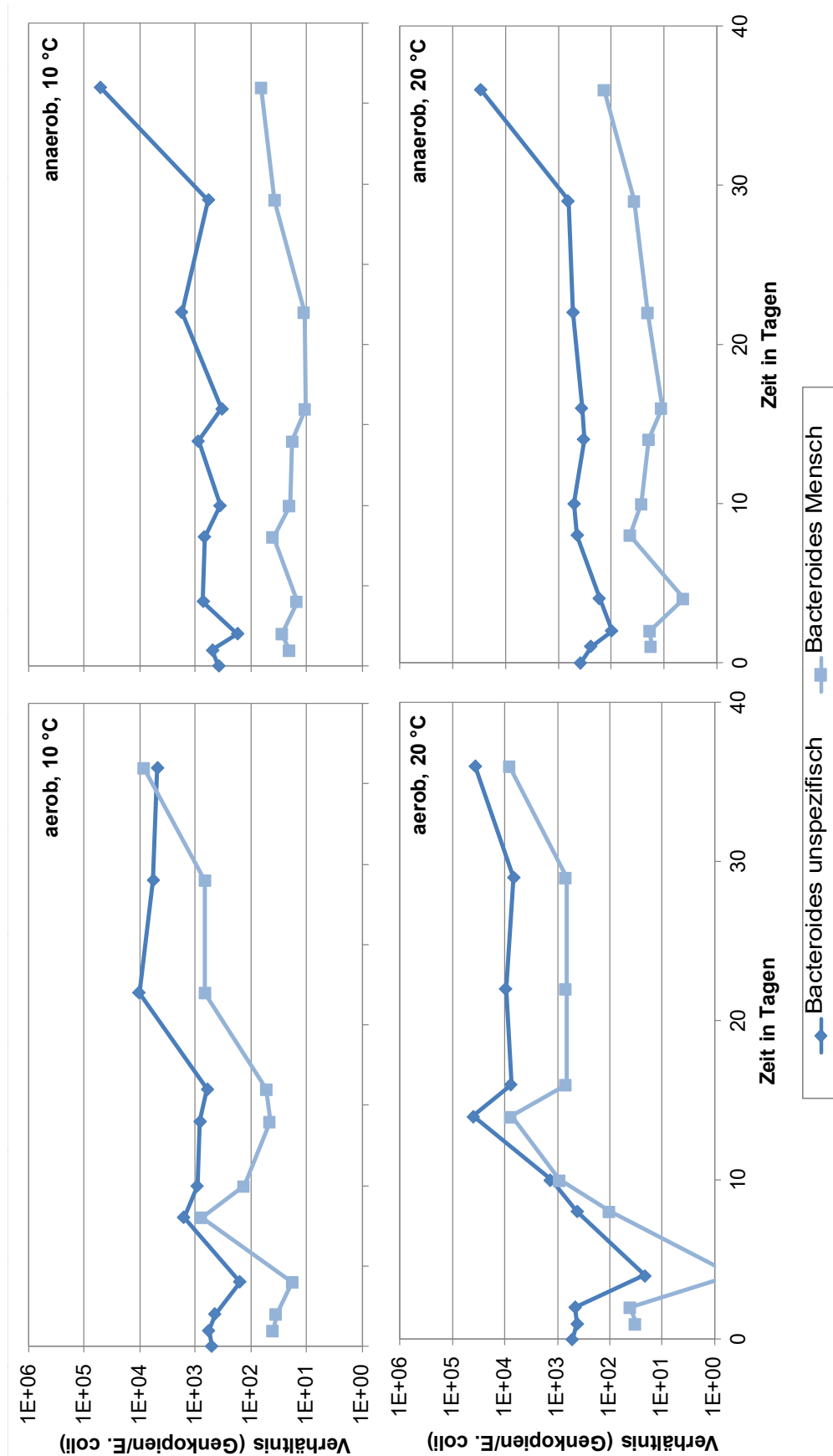


Abbildung 5.6: Verhältnis Marker/*E. coli* in den Untersuchungen zur Stabilität von Microbial Source Tracking-Markern.

Unter aeroben Bedingungen erhöht sich das Verhältnis *Bacteroides*-Marker/*E. coli* über die Zeit. Unter anaeroben Bedingungen ändert sich die Rate über 36 Tage kaum. Vor allem das Verhältnis des humanspezifischen Markers zu *E. coli* scheint über die Zeit – zumindest innerhalb von einem Monat – konstant zu bleiben.

Das Verhältnis zwischen den *Bacteroides*-Markern und *E. coli* steigt unter aeroben Bedingungen an, während es unter anaeroben Bedingungen konstant zu bleiben. Ein Grund dafür sind die niedrigen Abbauraten unter anaeroben Bedingungen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die genetischen Marker im PCR-Verfahren deutlich länger nachweisbar waren als die Indikatorbakterien, die mittels Kulturverfahren erfasst wurden. Insgesamt gibt es viele mögliche Einflussfaktoren auf die Elimination von MST-Markern und Indikatorbakterien in der Umwelt. Hierzu zählen z. B. das Sonnenlicht, der Salzgehalt oder Biofilme. Im Rahmen der Dissertation wurden orientierende Untersuchungen zur Stabilität durchgeführt. Die Ergebnisse geben wichtige Hinweise auf das Verhalten von genetischen Markern in der aquatischen Umwelt und ermöglichen eine vertiefende Diskussion der Ergebnisse aus den Untersuchungen im Einzugsgebietsmaßstab. Die Verhältnisse der Indikatorbakterien zu den MST-Markern lassen Rückschlüsse auf das Alter der Kontamination zu. Werden für die MST-Marker im Feld erhöhte Genkopienzahlen ermittelt, wohingegen die Bakterienzahlen für *E. coli* nicht erhöht sind, so spricht dies für eine Kontamination, die vor längerer Zeit eingetragen wurde.

5.3 Untersuchung im Einzugsgebietsmaßstab

5.3.1 Gallusquelle

Mit der Gallusquelle, wurde eine Karstquelle in die Untersuchungen einbezogen, die bereits Gegenstand einiger Studien war. Diese Studien befassten sich überwiegend mit dem Nachweis von organischen Mikroverureinigungen und *E. coli* (Heinz et al., 2006; Heinz et al., 2009; Hillebrand et al., 2012; Hillebrand et al., 2014; Schiperski et al., 2015a; Schiperski et al., 2015b; Zirlwagen et al., 2016). Im Rahmen dieser Studien konnten ein Regenrückhaltebecken, das sporadisch in ein Trockental entwässert (Heinz et al., 2006; Heinz et al., 2009), Mischkanalysteme (Hillebrand et al., 2012), landwirtschaftliche Aktivitäten (Hillebrand et al., 2014), und Oberflächenabfluss (Run-off) von Siedlungsflächen (Schiperski et al., 2015b) als potenzielle Kontaminationsquellen identifiziert werden. Durch den Einsatz von MST sollte nun die Relevanz der möglichen Eintragsquellen geprüft und eingeordnet werden.

Von Februar 2012 bis August 2013 wurden wöchentlich Proben aus der Gallusquelle entnommen. Bei besonderen Ereignissen wurden Vor-Ort-Kampagnen durchgeführt, im Rahmen derer die Probennahmefrequenz deutlich erhöht wurde. Alle Proben wurden auf die Indikatorbakterien *E. coli* und Enterokokken untersucht.

Die Ergebnisse aller Analysen sind in der nachfolgenden Abbildung zusammenfassend dargestellt. Um mögliche Zusammenhänge zwischen Trübung und Keimzahlen erfassen zu können, wurden sowohl die Trübungswerte (gemessen durch das Wasserwerk Hermentingen), als auch die mikrobiologischen Daten aufgetragen.

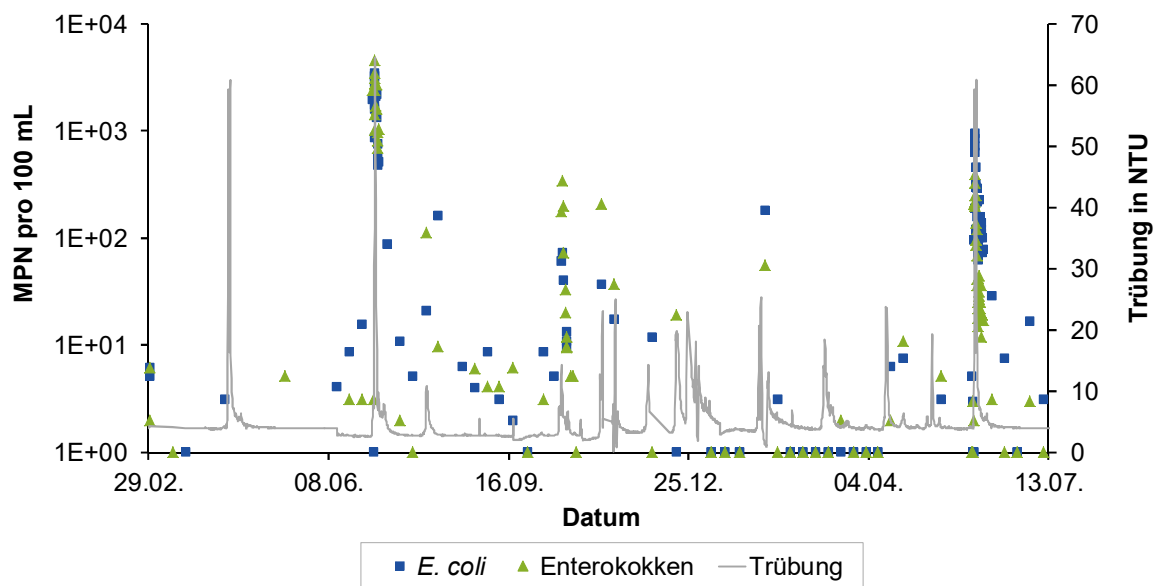


Abbildung 5.7: Vergleichende Darstellung der mikrobiologischen Untersuchungsergebnisse und der Trübungsdaten des Rohwassers der Gallusquelle von Januar 2012 bis Juli 2013.

Pronk et al. (2007) stellten in ihren Untersuchungen fest, dass hohe Trübungswerte immer mit hohen Konzentrationen an Bakterien (*E. coli* und Enterokokken) einhergingen, während starke bakterielle Verunreinigung des Quellwassers nicht immer durch ein Trübesignal angezeigt wurde. Pronk et al. unterscheiden in zwei verschiedene Arten von Trübe: Die primäre bzw. autochthone Trübe, die durch resuspendierte Sedimente entsteht, und die sekundäre bzw. allochthone Trübe. Sie fanden eine Korrelation zwischen bakterieller Verunreinigung des Quellwassers, allochthoner Trübe und dem Gehalt an gelöstem organischen Kohlenstoff (Dissolved Organic Carbon, DOC), wobei die Konzentration an DOC im Quellwasser zeitlich später als die Konzentrationen von *E. coli* und Enterokokken anstieg. Die Ergebnisse dieser Dissertation bestätigen die Erkenntnisse von Pronk et al. (2006), dass hohe Trübungswerte in der Regel mit hohen Konzentrationen an Bakterien (*E. coli* und Enterokokken) einhergehen, während starke bakterielle Verunreinigungen des Quellwassers nicht immer durch ein Trübesignal angezeigt werden.

Insgesamt wurden im Projektzeitraum fünf Ereignisse mit hoher Auflösung beprobt. Diese sind in der nachfolgenden Tabelle zusammenfassend aufgezählt.

Tabelle 5.13: Mikrobiologische Untersuchungszeiträume.

Zeitraum	Ereignis	Maximale Trübungswerte	Maximale <i>E. coli</i> -Werte
Februar 2012	Schneesmelze	9 NTU	$1,4 \cdot 10^1/100$ mL
Juli 2012	Starkregen führte zum Überlaufen der Regenrückhaltebecken im Einzugsgebiet.	65 NTU	$3,5 \cdot 10^3/100$ mL
Oktober 2012	Anstieg der Trübung – es trat kein Starkregen auf und auch keine andere Ursache konnte ermittelt werden.	14 NTU	$7,4 \cdot 10^1/100$ mL
Mai/Juni 2013	Hochwasser – tagelanger Starkregen führte zum Überlaufen der Regenrückhaltebecken im Einzugsgebiet. Aber bereits vor dem dauerhaften Starkregen waren immer wieder Niederschläge im Einzugsgebiet zu verzeichnen. Die extremen Niederschläge führten zur verstärkten Grundwasserneubildung. Die Schüttung der Gallusquelle stieg innerhalb weniger Stunden auf einen nicht mehr messbaren Wert an.	57 NTU	$9,6 \cdot 10^2/100$ mL
Juli/August 2013	Einmaliger Starkregen nach einer längeren Trockenperiode, der zum Überlaufen des Regenrückhaltebeckens führte.	5 NTU	$1,3 \cdot 10^3/100$ mL

Vergleicht man die *E. coli*-Zahlen nach Starkregenereignissen mit Überschlag des Regenrückhaltebeckens mit Daten aus früheren Jahren (Heinz et al., 2009), so wird deutlich, dass die Anzahl der fäkalen Indikatorbakterien, die in das Wasser der Gallusquelle gelangen, abgenommen hat. Im Jahre 2005 konnten nach solchen Ereignissen ca. 10^4 *E. coli*-Bakterien in 100 mL Wasser gefunden werden. Im Gegensatz dazu waren es im Untersuchungszeitraum maximal $3,5 \cdot 10^3$ *E. coli* pro 100 mL. Diese Verbesserung ist vor allem auf den Umbau des Regenrückhaltebeckens bei Bitz zurückzuführen. Das Speichervolumen wurde von ursprünglich ca. 6770 m³ auf ca. 8070 m³ erhöht. Gleichzeitig wurde das Überlaufbauwerk dergestalt umgebaut, dass einmal in das Becken eingetragene Schmutzstoffe nicht mehr am Überlauf entlasten können. Dazu wurde die Beckenreinigung so optimiert, dass einmal sedimentierte Fracht nicht wieder remobilisiert wird. Die Häufigkeit der Überläufe konnte deutlich reduziert werden (mündliche Mitteilung von Seiten des Abwasserverbandes Scher-Lauchert, des Zweckverband Wasserversorgung Zollernalb und der Kovacic Ingenieure GmbH).

In Mai 2013 und Juli 2013 konnten zusätzlich Proben für die mikrobiologische Analyse aus dem Regenrückhaltebecken bei Bitz gewonnen werden. Die *E. coli*- und Enterokokken-Keimzahlen in den Proben aus dem Regenrückhaltebecken lagen zwischen $2,4 \cdot 10^6$ und $9,2 \cdot 10^3$ pro 100 mL und vermitteln einen Eindruck über die Menge an fäkalen Keimen, die durch den Regenüberlauf ins Grundwasser eingetragen werden.

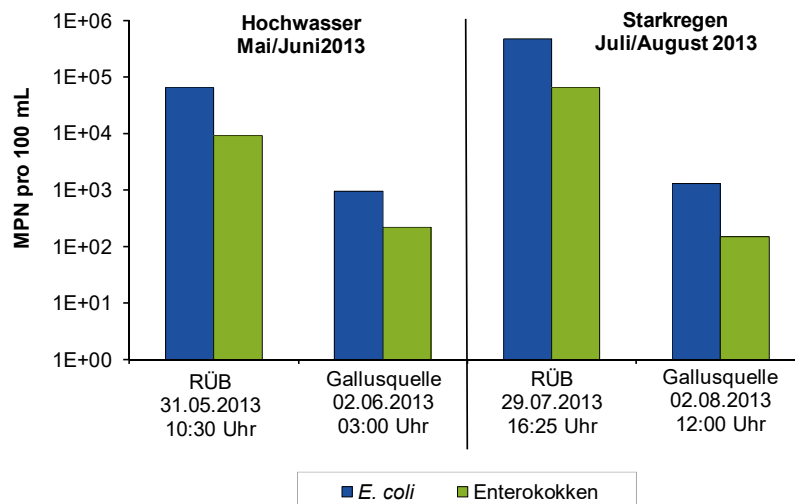


Abbildung 5.8: Vergleichende Darstellung der mikrobiologischen Untersuchungsergebnisse des Wassers aus dem Regenrückhaltebecken (RÜB) und des Rohwassers der Gallusquelle (maximal gemessener Wert im Folgezeitraum) zu den beiden Ereignissen.

Zusätzlich wurden 56 Proben mittels PCR auf das Vorkommen von humanen Polyomaviren untersucht. Die Proben wurden zwischen Februar 2012 und September 2012 entnommen. Der humane Polyomavirus, der ein guter Indikator für das Vorkommen humaner Fäkalkontaminationen ist, wurde in 8 der 56 Proben (14,3 %) nachgewiesen, wobei drei Positivbefunde nach einem Starkregenereignis mit Überschlag des Regenrückhaltebeckens im Jahr 2012 detektiert wurden.

2000 wurde erstmals das Vorkommen von humanen Polyomaviren im Abwasser beschrieben (Bofill-Mas et al., 2000). Seither wurden diese Viren im Abwasser auf der ganzen Welt in Konzentrationen von bis zu 10^8 Genkopien pro mL, wobei jede Genkopie als ein Virus eingestuft wird, nachgewiesen (Bofill-Mas et al., 2006). Humane Polyomaviren sind hochspezifisch für Menschen mit einer weiten Verbreitung in menschlichen Populationen (McQuaig et al., 2009). Die Viren werden hauptsächlich mit dem Urin, aber auch mit dem Stuhl ausgeschieden (Bofill-Mas et al., 2000; Guérineau et al., 2014; McQuaig et al., 2009). Der humane Polyomavirus JC wird aufgrund seiner hohen Prävalenz in Abwässern aus allen geografischen Gebieten, seiner Stabilität in der Umwelt und seiner Wirtsspezifität als humaner viraler Indikator vorgeschlagen. Kirs et al. (2016) untersuchten die Konzentration des humanen Polyomavirus in Bächen und Stränden in Oahu, Hawaii. Ihre Ergebnisse zeigten, dass die Bäche und an Strände stark durch anthropogene Aktivitäten beeinflusst werden (Kirs et al., 2016). In ähnlicher Weise zeigen die Daten für die Polyomaviren den negativen Einfluss von kommunalem Abwasser auf die mikrobiologische Wasserqualität der Gallusquelle.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden *Bacteroides* und mtDNA-basierte Werkzeuge zur Identifizierung von fäkalen Eintragsquellen in Rohwässern im Einzugsgebietsmaßstab etabliert. Durch den Einsatz von qualitativen PCR-Methoden zum Nachweis von MST-Markern konnten vielfach wirtsunspezifische *Bacteroides*-Sequenzen über den Untersuchungszeitraum nachgewiesen

werden. Diese Ergebnisse bestätigen die Daten aus den mikrobiologischen Untersuchungen des Quellwassers auf Indikatorbakterien, die zeigen, dass mehrfach im Jahr 2012 und 2013 fäkale Kontaminationen in unterschiedlichem Ausmaß an der Quelle auftraten. In den Phasen mit erhöhten Keimzahlen der Indikatorbakterien konnten immer wirtsunspezifische *Bacteroides*-Signale nachgewiesen werden. Es wurden aber auch wirtsunspezifische *Bacteroides*-Sequenzen gefunden, wenn keine oder nur sehr wenige Indikatorbakterien detektiert wurden. Die Untersuchungen zur Stabilität von MST-Markern zeigten, dass die genetischen Marker im PCR-Verfahren deutlich länger nachweisbar sind als die Indikatorbakterien, die mittels Kulturverfahren erfasst werden (siehe Kapitel 5.2.5). Aus diesem Grund konnten auch dann noch *Bacteroides*-Sequenzen im Wasser der Gallusquelle nachgewiesen werden, wenn die Untersuchung auf Indikatorbakterien negativ ausfiel.

Während Phasen mit erhöhter Trübung wurden auch vermehrt humane *Bacteroides*-Sequenzen nachgewiesen. Hier sind vor allem die Zeiträume Juli 2012, Mai/Juni 2013 und Juli/August 2013 zu nennen. In diesen Zeiträumen kam es zu Starkregenereignissen, die nachweislich zu einem Übertreten des Regenrückhaltebeckens im Einzugsgebiet führten. Da im Einzugsgebiet eine Mischkanalisation vorliegt, umfasst das gesammelte Wasser im Regenrückhaltebecken auch häusliches Abwasser. Dieser Anteil an häuslichem Abwasser könnte durch das Überlaufen ins Grundwasser eingetragen werden.

Karsteinzugsgebiete werden vorwiegend durch unterirdische Kanäle oder Höhlen entwässert, die durch die Erweiterung von Brüchen in löslichen Gesteinen wie Kalkstein oder Dolomit entstehen. Aufgrund der typischerweise dünnen Bodendeckschicht und der hohen Permeabilität des verkarsteten Gesteins, die zu kurzen Verweilzeiten führen, sind Karstquellen besonders anfällig für anthropogene Kontaminationen. Die Ergebnisse zur Erfassung von humanen MST-Markern belegen, dass auch die Gallusquelle anthropogen beeinflusst ist.

Um einen Überblick über die Ergebnisse der quantitativen Analysen für den gesamten Untersuchungszeitraum zu geben, wurden in der nachfolgenden Abbildung die Ergebnisse für die *Bacteroides*-basierten und mtDNA-Marker für vier Ereignisse vergleichend zu den *E. coli*-Werten dargestellt. Eine tabellarische Zusammenfassung der PCR-Ergebnisse ist im Anhang zu finden.

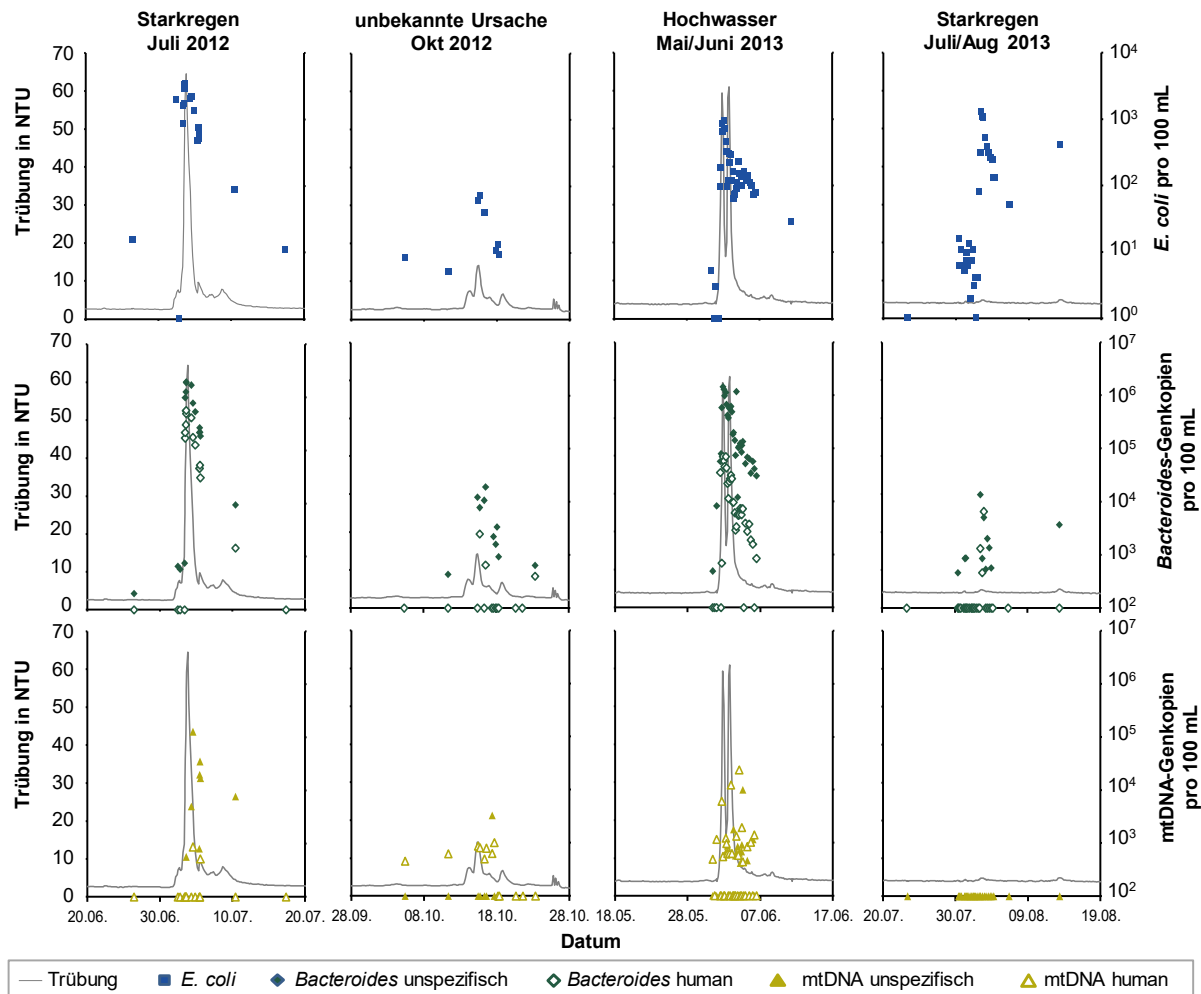


Abbildung 5.9: Darstellung der quantitativen Ergebnisse der Untersuchung auf *E. coli*, wirtsunspezifische und spezifische *Bacteroides* sowie mtDNA-Sequenzen für vier ausgewählte Ereignisse an der Gallusquelle.

Die Quantifizierung von wirtsunspezifischen *Bacteroides*-Sequenzen zeigte einen Anstieg der untersuchten Genabschnitte um 4-6 Log-Stufen nach Starkregenereignissen im Einzugsgebiet. Für das Starkregenereignis im Juni/Juli 2012 (Ereignis A) lagen die Genkopienzahlen für wirtsunspezifische und humanspezifische Bereiche auf einem vergleichbaren Niveau (Log-Stufen-Bereich). Außerdem wurden für diesen Zeitraum mehrere Proben positiv auf humane Polyomaviren getestet. D. h. in diesem Fall konnte häusliches Abwasser als Haupteintragsquelle identifiziert werden.

Betrachtet man das Verhältnis von MST-Marker und *E. coli*, so liegt der Wert für die wirtsunspezifischen *Bacteroides*-Marker im Mittel bei $1,5 \cdot 10^2$ und für die humanspezifischen Marker bei $3,7 \cdot 10^1$. Ein Vergleich mit den Daten aus den Untersuchungen zur Stabilität (siehe Kapitel 5.2.5) zeigt, dass es sich bei der Kontamination um einen frischen fäkalen Eintrag handelt. Dies deckt sich mit dem zeitlichen Zusammenhang zwischen Überschlag des Regenrückhaltebeckens und erhöhten Trübungswerten an der Gallusquelle.

Für das Hochwasser im Jahr 2013 liegen die Werte für die humanen Sequenzen deutlich unter denen für wirtsunspezifische *Bacteroides*-Sequenzen – d. h. es wird häusliches Abwasser eingetragen, aber auch andere Eintragsquellen scheinen eine wichtige Rolle zu spielen. Da es im Rahmen des Hochwassers zu multiplen fäkalen Einträgen (z. B. durch Wegschwemmen von Güllegruben) gekommen sein kann, ist dieses Ergebnis plausibel. Auch für das Ereignis im Oktober 2012, bei dem die Keimzahlen und *E. coli*-Zahlen aus unbekannter Ursache anstiegen, werden die wirtsunspezifischen Signale nicht durch die humanen Signale abgedeckt.

Parallel wurden PCR-Analysen durchgeführt, die sowohl Art-unspezifische mtDNA-Sequenzen als auch human-, Rinder-, Hühner- und Pferde-spezifische Bereiche erfassen. Der Nachweis von mtDNA-Sequenzen hat den Vorteil, dass diese sehr spezifisch sind. Leider ist ihre Anwendung aber durch das relativ geringe Ausscheiden von mtDNA durch den Wirt eingeschränkt. Nur bei sehr starken Kontaminationen liegen die mtDNA-Marker im quantifizierbaren bzw. nachweisbaren Bereich. Dieser Sachverhalt wurde auch durch die gewonnenen Ergebnisse unterstrichen. Zu den Zeiträumen mit erhöhter fäkaler Belastung wurden Art-unspezifische und humanspezifische mtDNA nachgewiesen. Diese positiven Befunde waren aber deutlich seltener als das Auftreten von *Bacteroides*-Signalen – sowohl wirtsunspezifisch als auch humanspezifisch.

Spezifische mtDNA-Marker für Rind und Pferd konnten zu keinem Probennahmezeitpunkt quantitativ erfasst werden. Aus diesem Grund sind die mtDNA-Ergebnisse nicht in der Abbildung dargestellt. Im Gegensatz dazu, konnten die quantitativen Untersuchungen das Vorkommen von Hühner-spezifischer mtDNA im Frühjahr 2012 und 2013 bestätigen. Es wurden maximal $1,1 \cdot 10^3$ Hühner-spezifische mtDNA-Kopien pro 100 mL detektiert. Das Einzugsgebiet der Gallusquelle ist durch große Wald-, Acker- und Grünlandflächen gekennzeichnet. Eine Hühnerfarm mit etwa 40.000 Hühnern sowie einige Rinder- und Pferdeweiden befinden sich im Einzugsgebiet. Nach Angaben der örtlichen Landwirte (mündliche Mitteilung) korrespondiert das Vorhandensein von Hühner-mtDNA-Sequenzen mit der üblichen Praxis der Düngung mit Geflügelmist in der Frühjahrsperiode. Das Auftreten der Hühner-spezifischen Marker ging aber nicht mit einer Zunahme der fäkalen Indikatoren einher.

Insgesamt erwiesen sich die eingesetzten MST-Methoden – insbesondere die *Bacteroides*-basierten Verfahren – als wirksame Werkzeuge zur Identifizierung von fäkalen Einträgen in die untersuchte Karstquelle. Der Eintrag von Kontaminationen in die Grundwasserleiter von Karstquellen stellt weltweit ein Problem dar. Vergleichbare *Bacteroides*-basierte MST-Untersuchungen wurden bereits an Karstquellen in Westgaliläa (Israel) und im Mittleren Westen der USA erfolgreich eingesetzt (Diston und Wicki, 2015; Ohad et al., 2015; Zhang et al., 2014). Ähnlich wie in dieser Studie belegen die Untersuchungen, dass die mikrobiologische Wasserqualität von Karstgrundwassersystemen häufig mit humanen Fäkaleinträgen und Einträgen durch Viehbestand negativ beeinflusst wird. Im Gegensatz dazu wurden bei alpinen Karstgrundwässern in Österreich vor allem Kontaminationen durch Wiederkäuer wie Gämsen und Rehwild als Haupteintragsquelle identifiziert (Reischer et al., 2008; Reischer et al., 2011).

Zusätzlich zum Nachweis von MST-Markern wurden Fingerprint-Analysen durchgeführt. Für die ersten Fingerprint-Untersuchungen wurden Primer eingesetzt, die sich gegen universelle

Bereiche der 16S rDNA richten. Exemplarische Ergebnisse sind in der nachfolgenden Abbildung gezeigt.

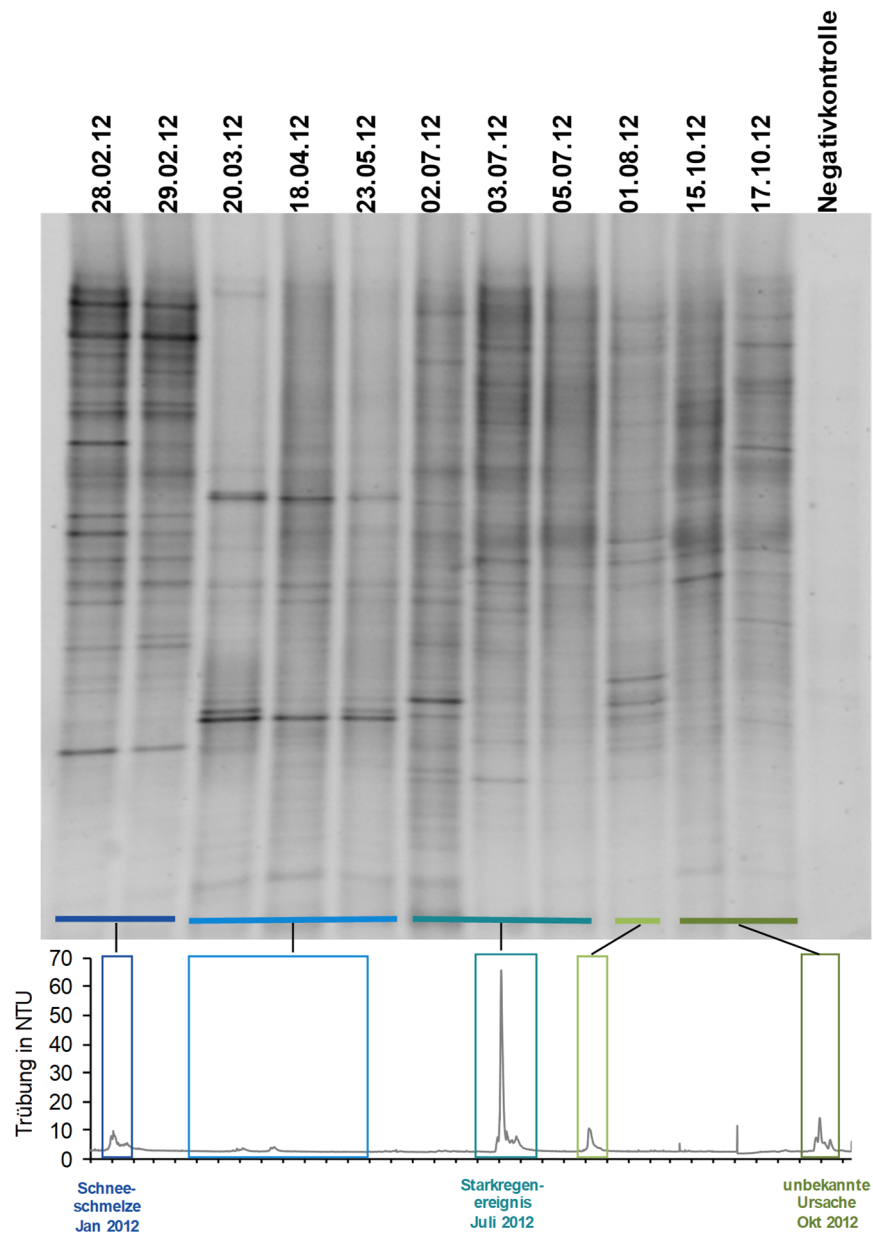


Abbildung 5.10: Ergebnis der DGGE-Untersuchungen mit wirtsunspezifischen bakteriellen 16S rDNA-Genabschnitten als Zielsequenz.

Der visuelle Vergleich der Bandenmuster zeigt, dass sich die Zusammensetzung der Mikroorganismen im Quellwasser der Gallusquelle über das Jahr 2013 mehrfach verändert hat. Vergleicht man die Proben vom 20.3.2012 bis zum 23.05.2012, die während einer Phase mit stabiler und geringer Trübung genommen wurden, so erkennt man deutliche Ähnlichkeiten, was auf eine relativ konstante Bakterienflora hinweist. Die Bakteriengemeinschaft verändert sich

deutlich in Phasen mit erhöhter Trübung. Allerdings lieferte die DGGE-Analyse mit den universellen 16S rDNA-basierten Primern ein relativ diffuses Bandenmuster mit sehr vielen Banden, so dass von einer Software-basierten Auswertung abgesehen wurde.

Für weiterführende Analysen wurden Primer eingesetzt, die spezifisch an ribosomale RNA-Gene von Bakterien der Gattung *Bacteroidales* binden. Eine Auswahl an Proben aus der Gallusquelle, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Jahr 2012 genommen wurden, wurde unter Verwendung dieser *Bacteroides*-Primer und PCR-DGGE untersucht (siehe nachfolgende Abbildung).

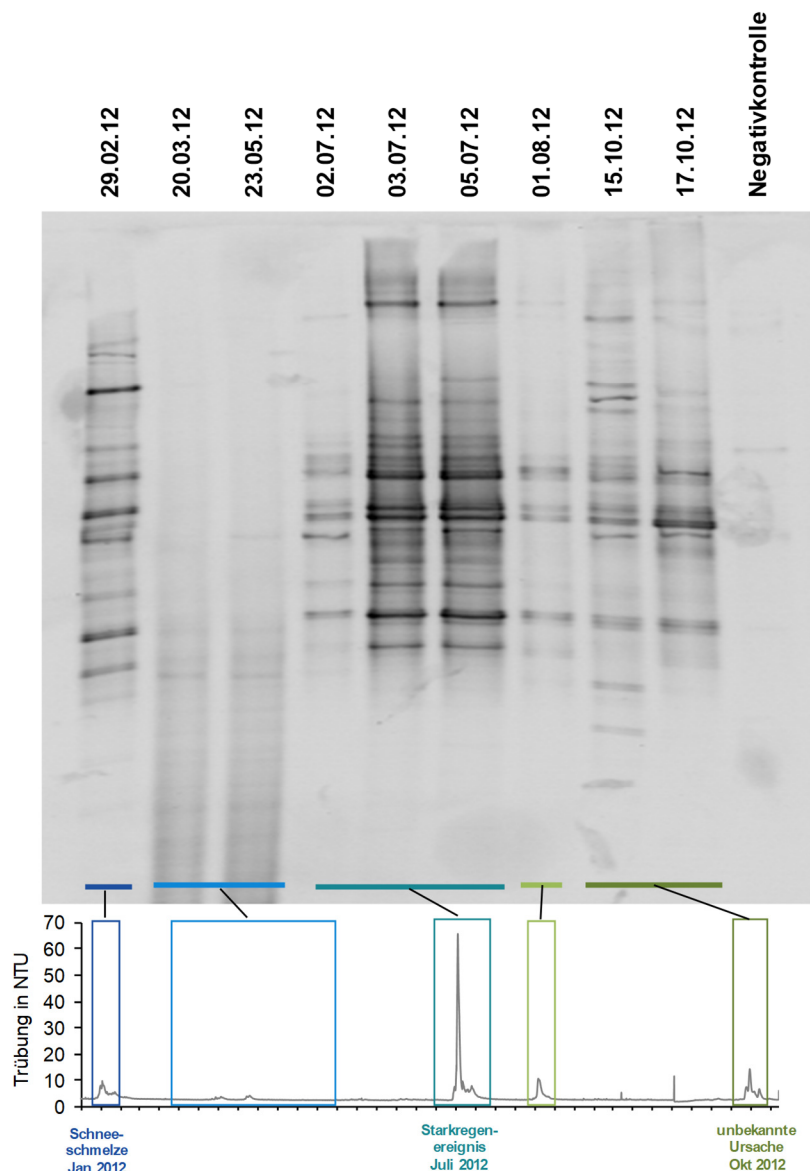


Abbildung 5.11: DGGE-Bandenmuster von Proben aus der Gallusquelle unter Einsatz von *Bacteroides*-Primern.

Die Untersuchungen ergaben ein relativ einheitliches Bandenmuster zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten. Proben, bei denen keine oder nur eine sehr geringe fäkale Kontamination vorlag, ergaben – wie erwartet – keine deutlichen Banden. Die Tatsache, dass sich die

Fingerprints des Quellwassers zu verschiedenen Zeitpunkten stark gleichen, legt die Vermutung nahe, dass die Kontaminationen den gleichen Ursprung haben.

Im nächsten Schritt wurden sowohl unterschiedliche Kotproben (Pferd, Rind, Huhn und Mensch) als auch Proben aus der Gallusquelle in die PCR-DGGE-Untersuchungen eingesetzt.

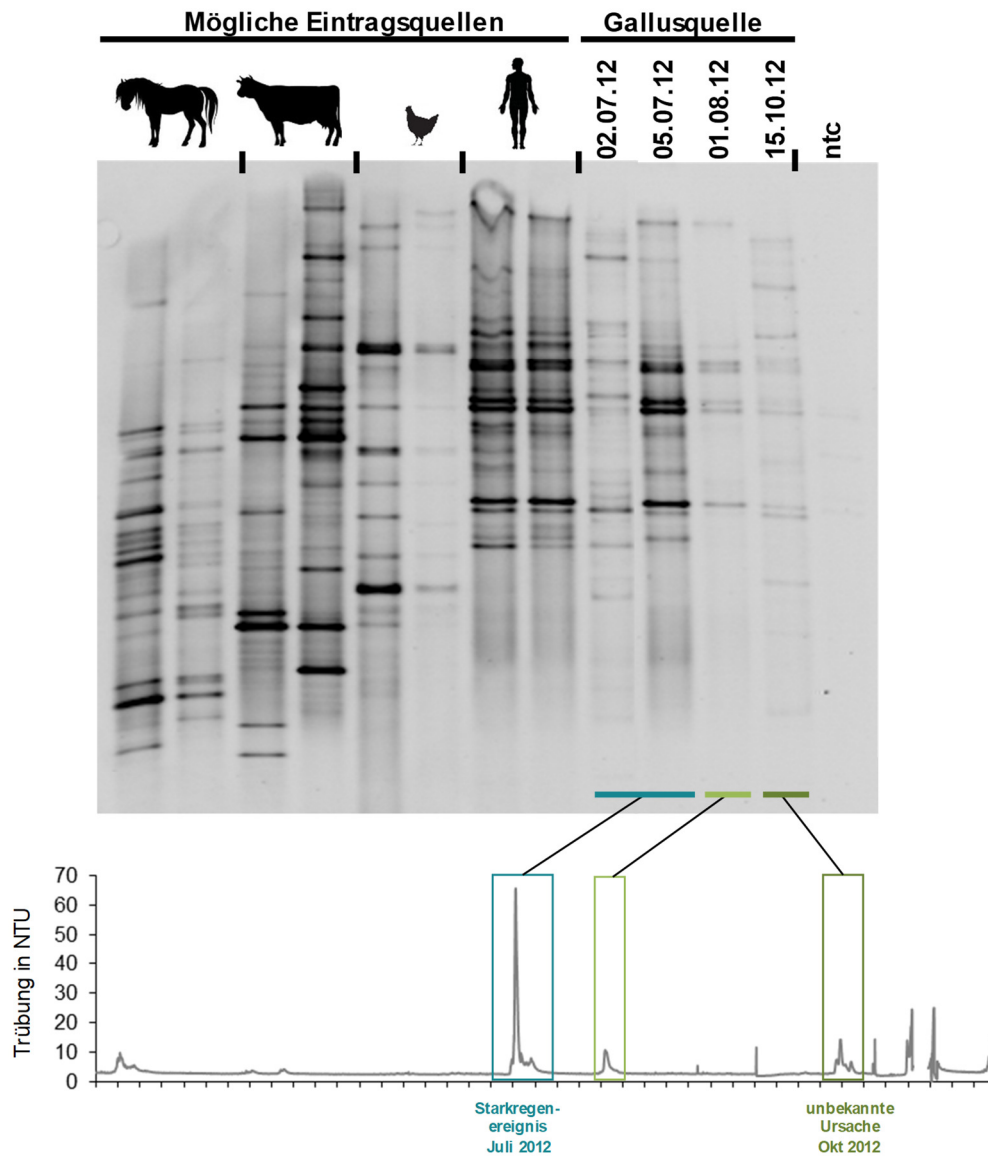


Abbildung 5.12: DGGE-Bandenmuster von Proben aus der Gallusquellen und Kotproben unterschiedlichen Ursprungs unter Einsatz von *Bacteroides*-Primern.

Der visuelle Vergleich der Bandenmuster macht deutlich, dass die Fingerprintmuster, die in den Proben aus der Gallusquelle auftreten, dem Muster der humanen Kotproben sehr ähneln. Dies wurde auch durch eine Ähnlichkeitsanalyse mit der Software PyElph bestätigt (siehe Abbildung 5.13). Die Übertragung und Analyse des Gelbildes in die Software PyElph führt zu einem

Dendrogramm, in dem die Proben der Gallusquelle in die gleiche Gruppe wie die Proben aus der kommunalen Kläranlage eingeordnet werden.

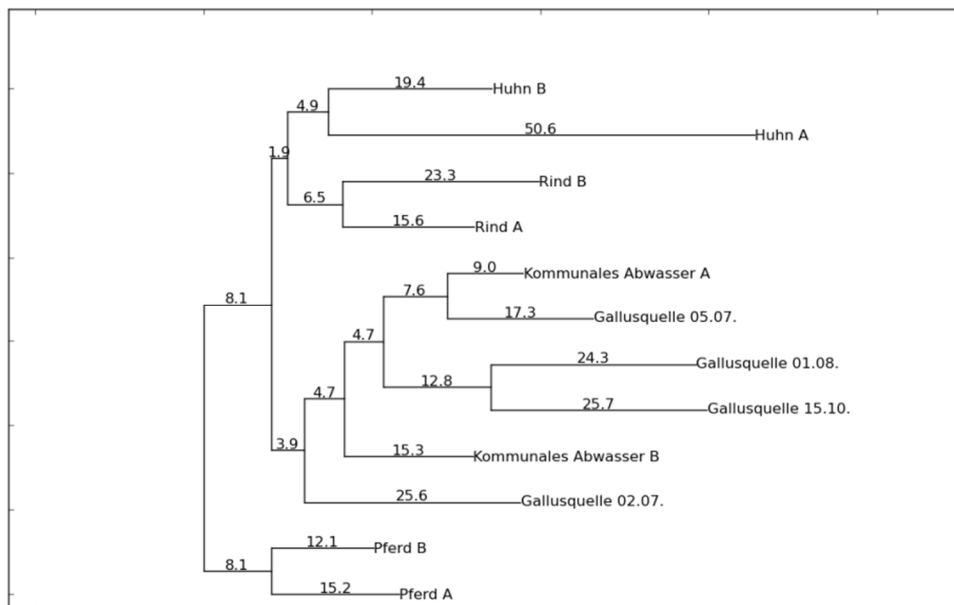


Abbildung 5.13: Dendrogramm zur Ähnlichkeitsanalyse der DGGE-Bandenmuster von Proben aus der Gallusquelle und Kotproben unterschiedlichen Ursprungs erstellt mit dem Programm PyElph. Die über den Ästen angegebenen Zahlen entsprechen den Astlängen.

Die Ergebnisse bestätigen die Daten der PCR- und qPCR-Analysen auf humane MST-Marker – eine erhöhte Trübung geht mit einem Anstieg der mikrobiellen Belastung einher, die vor allem durch humanes Abwasser verursacht wird.

Bislang war der Einsatz der DGGE-Methode als Datenbank- und Kultur-unabhängige Verfahren zum Zwecke der Identifizierung von fäkalen Kontaminationen kaum beschrieben (siehe Kapitel 1.2.2.2). Die Anwendung der Methodik ist durch die Verfügbarkeit von Vergleichsproben und die begrenzte Probenanzahl limitiert. Trotzdem zeigen die Ergebnisse, dass die DGGE-Analyse zur Identifizierung von fäkalen Kontaminationen beitragen kann. Sie stellt ein ergänzendes Werkzeug zur quantitativen PCR-Analyse von wirtsspezifischen Sequenzen dar.

Neben mikrobiellen Verunreinigungen von Grundwasserleitern wird auch zunehmend das Auftreten organischer Spurenstoffe erfasst (Schwarzenbach et al., 2006; Ternes, 2007). Während zu Oberflächengewässern eine große Datenbasis existiert, sind Informationen zu Spurenstoffen in Karstgebieten nur vereinzelt zu finden. Heinz et al. (2009) untersuchten Flammenschutzmittel, Duftstoffe, ein Bakterizid und Weichmacher. Während stark sorbierende Stoffe zurückgehalten wurden, konnten andere in hohen Konzentrationen gemeinsam mit den untersuchten Indikatorbakterien im Wasser der Gallusquelle nachgewiesen werden.

Das Auftreten von spezifischen Spurenstoffen – sogenannten Indikatorsubstanzen – ermöglicht Rückschlüsse auf verschiedene Eintragsquellen (siehe Kapitel 1.2.3 „Source Tracking mit

chemischen Substanzen“). Parallel zu den mikro- und molekularbiologischen Untersuchungen wurden an der Gallusquelle auch chemische Indikatorsubstanzen bestimmt (Zirlewagen et al., 2016). Die untersuchten Substanzen umfassen u. a. Cyclamat, Metazochlor und Valsartansäure (Zirlewagen et al., 2016). Acesulfam zählt zu einer Gruppe von Abwasser-spezifischen Indikatorsubstanzen, welche den Eintrag von unbehandeltem und behandeltem Abwasser anzeigen (Warner et al., 2019). Hierbei handelt es sich um Verbindungen, die sich durch eine hohe Persistenz in der Umwelt auszeichnen und kaum oder unvollständig in Kläranlagen entfernt werden. Acesulfam ist einer der moderneren synthetischen Süßstoffe. Substanzen, die in der Kläranlage gut entfernt werden, sind z. B. Koffein und Cyclamat (häufig verwendeter synthetischer Süßstoff). Diese Stoffe sind gute Anzeiger von Kontaminationen durch unbehandeltes Abwasser. Zusätzlich sind inzwischen auch Substanzen bekannt, die in behandeltem, aber nicht in unbehandeltem Abwasser vorkommen. Ein Beispiel ist die Valsartansäure, die durch den mikrobiellen Abbau von Valsartan (Blutdrucksenker) und vermutlich weiteren Sartanen in der Kläranlage entsteht und sich durch eine hohe Persistenz auszeichnet (Nödler et al., 2013). Neben den Abwasser-Indikatoren sind auch Indikatoren für einen landwirtschaftlichen Einfluss in der Literatur beschrieben. Ein Beispiel ist das Herbizid Metazachlor, das als abbaubar gilt (Beulke und Malkomes, 2001). Die unterschiedlichen Indikatoren zeichnen sich durch unterschiedliche Halbwertszeiten in der Umwelt aus, wobei diese, abhängig vom jeweiligen System, große Schwankungen aufweisen können. Für Acesulfam liegen die beobachteten Halbwertszeiten im Bereich von 15 Jahren (Robertson et al., 2013), für Cyclamat bei 60 Tagen und für Koffein bei 4 Tagen (Hillebrand et al., 2015). Aufgrund seiner besonders hohen Abbaubarkeit ist Koffein ein besonders sensibler Anzeiger von „frischen“ Kontaminationen durch unbehandeltes Abwasser. Dagegen ist Cyclamat aufgrund hoher Einträge und geringer Abbauraten ein robuster Indikator für unbehandeltes Abwasser (Warner et al., 2019).

Drei starke Regenereignisse mit Niederschlagssummen von jeweils größer als 45 mm pro Stunde führten 2013 zum einem Hochwasser an der Gallusquelle (Standort: Burladingen; Daten: Deutscher Wetterdienst, 2015). Wie für die Gallusquelle typisch, kam es innerhalb weniger Stunden zu einer Zunahme der Quellschüttung und einer Abnahme von Leitfähigkeit und Temperatur. Die MST-Untersuchungen zeigten für diesen Zeitraum einen Eintrag von humanen Markern (*Bacteroides* und mtDNA). Allerdings ist die Zunahme der entsprechenden Genkopien im Vergleich zu anderen Ereignissen und zu den Zahlen der wirtsunspezifischen Marker nicht sehr ausgeprägt. Dies ist ein Hinweis, dass hier noch andere Eintragsquellen eine Rolle spielen könnten. Dies wird auch durch die Ergebnisse der chemischen Untersuchungen bestätigt. Die Analysen belegen einen Durchbruch von Cyclamat im Rahmen des Hochwasserereignisses und damit den Eintrag von frischem unbehandeltem Abwasser (Zirlewagen et al., 2016). Zusätzlich konnte das Herbizid Metazachlor nachgewiesen werden (Zirlewagen et al., 2016), das den Eintrag über Ackerflächen anzeigt.

Nach dem kurzen aber intensiven Regenereignis vom 29.07.2013, das zu einem einzelnen Überlauf des Regenrückhaltebeckens Bitz führte, waren nur minimale Reaktionen der Schüttung und der elektrischen Leitfähigkeit an der Quelle zu verzeichnen. Dies weist auf eine nur minimale Grundwasserneubildung hin. Auch für dieses Ereignis war ein Durchbruch von Cyclamat zu beobachten (Zirlewagen et al., 2016). Ein Nachweis von Metazachlor blieb aus. Analog zur Cyclamat-Konzentration stiegen die *E. coli*- und Enterokokken-Zahlen an (siehe Abbildung 5.14).

Des Weiteren konnten in diesem Zeitraum vereinzelt humanspezifische *Bacteroides*-Sequenzen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der mikro- und molekularbiologischen Untersuchungen sind also im Einklang mit den chemischen Analysedaten.

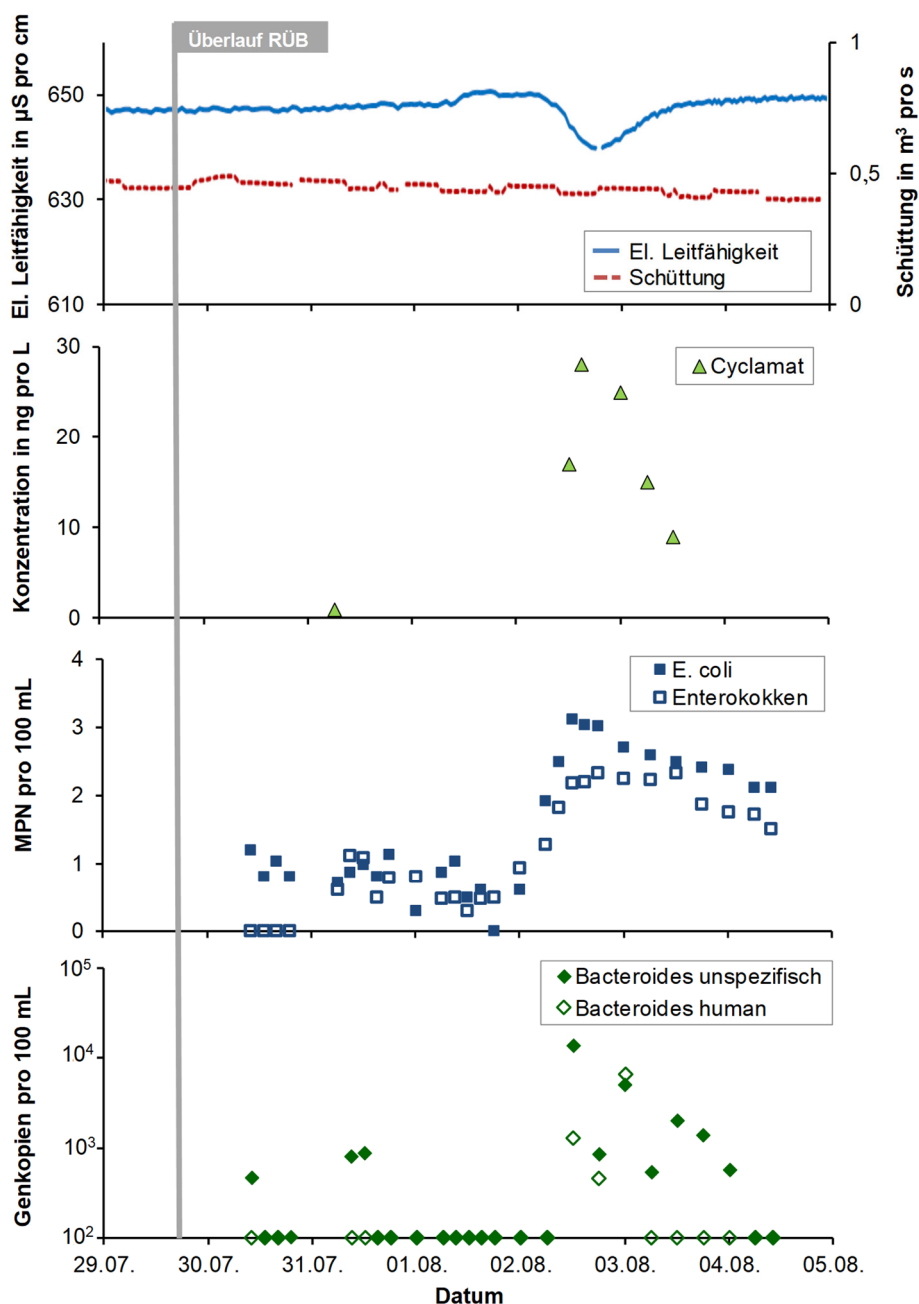


Abbildung 5.14: Starkregen Juli 2013: Schüttung, elektrische Leitfähigkeit, Konzentration von Cyclamat (Zirlewagen et al., 2016), *E. coli*-, Enterokokken-Zahlen und Genkopien der *Bacteroides*-Marker im Wasser der Gallusquelle.

Valsartansäure konnte zu keinem Zeitpunkt im Wasser der Gallusquelle nachgewiesen werden, weshalb ein signifikanter Einfluss von behandeltem Abwasser auf die Wasserqualität unwahrscheinlich war (Zirlewagen et al., 2016). Metazachlor konnte nur nach Niederschlagsereignissen und auch nur in den Frühlings- bis Herbstmonaten im Quellwasser nachgewiesen werden

(Zirlewagen et al., 2016). Insgesamt zeigen alle Ergebnisse, dass im ländlichen Karsteinzugsgebiet der Gallusquelle ein Regenrückhaltebecken die Haupteintragsquelle für Kontaminationen ist.

Die vermutete hydraulische Anbindung des Regenrückhaltebeckens zur Gallusquelle konnte auch durch Tracer-Versuche eindeutig bestätigt werden (Tranter et al., 2017). Die Maximalgeschwindigkeit von $149 \text{ m} \cdot \text{h}^{-1}$ hebt die schnellen Fließgeschwindigkeiten durch Karströhren hervor. Die geringe Wiederfindung des Tracers von 14,1 % ist andererseits ein Indiz für ein gewisses Retentionsvermögen entlang der Fließstrecke. Dies wurde durch einen erneuten Tracerdurchgang 16 Tage nach der Eingabe bestätigt, welches durch ein starkes Regenereignis hervorgerufen wurde (Tranter et al., 2017).

Insgesamt konnten durch den Einsatz molekularbiologischen MST-Methoden mehrfach humane Signale während Phasen mit erhöhter Trübung nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Verschmutzung des Quellwassers durch humane Einträge nach Starkregenereignissen im Untersuchungsgebiet von besonderer Relevanz sind. Da die Ausbringung von Klärschlamm auf landwirtschaftliche Felder in Wasserschutzgebieten in Deutschland verboten ist, kann der Eintrag von menschlichem Abwasser nur über Leckagen in der Kanalisation, über Klärgruben und den Überlauf von Regenrückhaltebecken erfolgen. Die Ergebnisse dieser Arbeit sowie den Daten aus früheren Studien (Heinz et al. 2006 und 2009; Tranter et al. 2017; Zirlewagen et al. 2016) legen die Vermutung nahe, dass das Regenrückhaltebecken, das im Zustrom der Quelle liegt, eine wichtige Quelle für fäkale Kontaminationen in das Quellwasser darstellt. Der Umbau des Überlaufbeckens führte bereits zu einer wesentlichen Verbesserung der Quellwasserqualität. Durch den Umbau konnte sowohl die Anzahl der Überlaufereignisse als auch die eingetragene Menge an fäkalen Bakterien während der einzelnen Ereignisse deutlich reduziert werden. Trotzdem kommt es noch mehrfach im Jahr zu einem Überlauf des Beckens. Deshalb wird eine weitere Optimierung des Beckens empfohlen. Nichtsdestotrotz können in bestimmten Zeiträumen auch fäkale Einträge von Nutztieren einen Einfluss auf die Wasserqualität der Gallusquelle haben.

5.3.2 Wasserwerke Tiefwerder und Kaulsdorf

Für das Einzugsgebiet des Wasserwerkes Tiefwerder wurden Grundwasser- und Oberflächenwasserproben analysiert. In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse der wirtsunspezifischen MST-Marker für die drei Probennahmestellen Galerie Schildhorn Brunnen 2, Brunnen 4 und Unterhavel (Schildhorn) vergleichend dargestellt. Die Konzentration der wirtsunspezifischen Marker gibt einen Hinweis auf die Stärke der fäkalen Gesamtkontamination.

Tabelle 5.14: Ermittelte Konzentrationen der wirtsunspezifischen *Bacteroides*- und mtDNA Marker (AIIBac296f/412r und Umito2-G/-D2) in Proben aus dem Einzugsgebiet Tiefwerder (n.a. = nicht analysiert).

Proben- nahme	Grundwasser				Oberflächenwasser	
	Brunnen 2		Brunnen 4		Unterhavel (Schildhorn)	
	<i>Bacteroides</i>	mtDNA	<i>Bacteroides</i>	mtDNA	<i>Bacteroides</i>	mtDNA
Kopien/mL						
08.07.2015	$4,8 \cdot 10^1$	< LQ	$6,0 \cdot 10^1$	$9,7 \cdot 10^1$	$4,5 \cdot 10^4$	< LQ
15.07.2015	$1,5 \cdot 10^1$	< LQ	< LQ	< LQ	$5,0 \cdot 10^4$	< LQ
22.07.2015	$1,0 \cdot 10^2$	< LQ	$1,2 \cdot 10^1$	< LQ	$3,6 \cdot 10^4$	< LQ
29.07.2015	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	$8,8 \cdot 10^3$	< LQ
05.08.2015	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	$1,0 \cdot 10^1$	< LQ
12.08.2015	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	$6,6 \cdot 10^2$	< LQ
19.08.2015	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	$5,1 \cdot 10^2$	< LQ
25.08.2015	$8,3 \cdot 10^1$	< LQ	$5,3 \cdot 10^1$	< LQ	$6,4 \cdot 10^2$	< LQ
02.09.2015	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	$4,9 \cdot 10^1$	< LQ
10.09.2015	< LQ	$2,0 \cdot 10^4$	< LQ	$7,0 \cdot 10^0$	$4,1 \cdot 10^3$	< LQ
16.09.2015	< LQ	< LQ	$9,6 \cdot 10^0$	< LQ	$1,1 \cdot 10^2$	< LQ
23.09.2015	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	$1,6 \cdot 10^3$	< LQ
30.09.2015	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	$2,7 \cdot 10^3$	< LQ
07.10.2015	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	$1,3 \cdot 10^3$	< LQ
14.10.2015	$2,0 \cdot 10^1$	$2,4 \cdot 10^1$	$2,0 \cdot 10^1$	$1,6 \cdot 10^1$	$7,7 \cdot 10^2$	< LQ
21.10.2015	$5,0 \cdot 10^2$	$6,1 \cdot 10^1$	$1,3 \cdot 10^1$	$9,8 \cdot 10^0$	$8,8 \cdot 10^3$	< LQ
28.10.2015	$1,7 \cdot 10^1$	$1,8 \cdot 10^1$	$1,4 \cdot 10^1$	$2,0 \cdot 10^1$	$1,2 \cdot 10^3$	< LQ
04.11.2015	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	$1,6 \cdot 10^6$	< LQ
11.11.2015	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	$1,1 \cdot 10^3$	< LQ
18.11.2015	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	$3,7 \cdot 10^4$	< LQ
02.12.2015	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	$7,2 \cdot 10^4$	< LQ
09.12.2015	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	n.a.	< LQ
16.12.2016	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	$1,2 \cdot 10^2$	< LQ

Die ermittelten Konzentrationen der wirtsunspezifischen Marker in den Proben aus der Brunnengalerie lagen meist unter oder nur knapp über dem LQ. In keiner dieser Proben konnten das LAGeSo Indikatororganismen wie *E. coli*, Enterokokken oder auch somatische Coliphagen nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurden diese Proben nicht auf das Vorkommen von spezifischen Markern untersucht.

Neben Bakterien, die bisher zur Qualitätskontrolle von Trinkwasser eingesetzt wurden, scheiden Menschen und andere Säugetiere auch mit somatischen Zellen mitochondriale DNA über Fäkalien aus. Diese scheint durch ihre hohe Spezifität als MST-Marker geeignet (Caldwell et al., 2011), aber die Ergebnisse zeigen, dass sich der Nachweis dieser Sequenzen in Umweltproben schwierig gestaltet. In keiner der untersuchten Proben aus dem Einzugsgebiet Tiefwerder konnten unspezifische mtDNA-Sequenzen detektiert werden. Aus diesem Grund wurde auf die Analyse von wirtsspezifischen mtDNA-Markern verzichtet.

In der Unterhavel (Schildhorn) konnte zu allen untersuchten Zeitpunkten der unspezifische *Bacteroides*-Marker quantifiziert werden. Die Konzentrationen bewegten sich zwischen 10^1 und

10⁶ Kopien/mL. Am niedrigsten waren die Konzentrationen im August, am höchsten jeweils im Juli und im November/Dezember.

Tabelle 5.15: Ermittelte Konzentrationen der Indikatorbakterien und wirtsspezifischen *Bacteroides*-Marker in Proben aus der Unterhavel

Proben- nahme	Indikatorbakterien		<i>Bacteroides</i> -Marker				
	<i>E. coli</i>	Entero- kokken	Unspezi- fisch AllBac296f/ 412r	Mensch HF183/ Bac708R	Hund* DF 475 F/ Bac708R	Wieder- käufer BacR_f/_r	Schwein Pic2 Bac 41 F/ 163 R
	Bakterien/100 mL		Kopien/mL				
08.07.2015	15	<15	4,5·10 ⁴	5,0·10 ⁰	+	< LQ	< LQ
15.07.2015	<15	15	5,0·10 ⁴	1,1·10 ¹	+	< LQ	< LQ
22.07.2015	15	<15	3,6·10 ⁴	2,2·10 ¹	+	< LQ	< LQ
29.07.2015	<15	61	8,8·10 ³	9,4·10 ⁰	+	< LQ	< LQ
05.08.2015	<15	<15	1,0·10 ¹	< LQ	+	< LQ	< LQ
12.08.2015	93	30	6,6·10 ²	< LQ	+	< LQ	< LQ
19.08.2015	<15	<15	5,1·10 ²	< LQ	+	< LQ	< LQ
25.08.2015	15	<15	6,4·10 ²	< LQ	+	< LQ	< LQ
02.09.2015	46	<15	4,9·10 ¹	< LQ	+	< LQ	< LQ
10.09.2015	15	<15	4,1·10 ³	1,6·10 ¹	+	1,5·10 ¹	< LQ
16.09.2015	127	30	1,1·10 ²	< LQ	+	< LQ	< LQ
23.09.2015	15	15	1,6·10 ³	3,1·10 ¹	+	3,9·10 ⁰	< LQ
30.09.2015	15	<15	2,7·10 ³	2,8·10 ¹	+	< LQ	< LQ
07.10.2015	504	30	1,3·10 ³	< LQ	+	7,2·10 ¹	< LQ
14.10.2015	197	<15	7,7·10 ²	6,3·10 ¹	+	< LQ	< LQ
21.10.2015	861	77	8,8·10 ³	< LQ	+	1,4·10 ¹	< LQ
28.10.2015	179	15	1,2·10 ³	4,4·10 ¹	+	9,1·10 ⁰	< LQ
04.11.2015	568	15	1,6·10 ⁶	3,1·10 ²	+	2,3·10 ⁰	< LQ
11.11.2015	621	94	1,1·10 ³	1,5·10 ²	3,4·10 ²	6,0·10 ⁰	8,4·10 ⁰
18.11.2015	3212	559	3,7·10 ⁴	3,7·10 ³	+	3,2·10 ¹	< LQ
02.12.2015	12690	1605	7,2·10 ⁴	9,3·10 ³	2,4·10 ²	9,4·10 ¹	< LQ

* Aufgrund der Coamplifikation von wirtsunspezifischen Produkten bei niedrigen Ausgangskonzentrationen wurden positiv/negativ-Ergebnisse angegeben, wobei das Auftreten des spezifischen Amplifikats elektrophoretisch überprüft wurde. Bei höheren Kopienzahlen (> 10² Kopien/mL) war eine Quantifizierung möglich

In allen Monaten – bis auf August – konnte der humanspezifische Marker quantitativ erfasst werden. Die Konzentration des humanen Markers lag bis Oktober zwischen 10⁰ und 10¹ Kopien/mL. Im November und Dezember stiegen die Werte auf 10² und 10³ Kopien/mL.

Wiederkäuer- und Schweine-spezifische Sequenzen konnten nicht oder nur in sehr geringen Konzentrationen erfasst werden. Der Hunde-spezifische Marker konnte in allen Proben nachgewiesen werden, wobei die Konzentrationen am Jahresende 2015 höher und damit im quantifizierbaren Bereich lagen.

Für die Unterhavel wurden Abwasser, Regenüberläufe und der Badebetrieb als mögliche Kontaminationsquellen in Betracht gezogen. Das Klärwerk Ruhleben entwässert zum Teil in die Unterhavel, und die nicht schutzzonengerecht ausgebauten Straßen sorgen dafür, dass das Regenwasser direkt in Richtung Wasserwerk abgeleitet wird. Insgesamt wurde für das

Oberflächengewässer Unterhavel (Schildhorn) eine fäkale Belastung mit Konzentration von $1,0 \cdot 10^1$ bis $1,6 \cdot 10^6$ Kopien des wirtsunspezifischen *Bacteroides*-Markers pro mL ermittelt. Sowohl Mensch als auch Hund konnten als Kontaminationsquellen identifiziert werden.

Betrachtet man das Verhalten der Parameter über den Untersuchungszeitraum von Juli bis Dezember 2015, so kann ein Anstieg der Werte beobachtet werden. Zum einen stieg die Konzentration der *E. coli*-Bakterien (ermittelt durch das LAGeSo). Es wurden Unterschiede von bis zu 3 Log-Stufen zwischen Juli und Dezember ermittelt. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei den Konzentrationen der Enterokokken und somatischen Coliphagen (ermittelt durch das LAGeSo, Daten nicht gezeigt). Zum anderen nahm auch die Konzentration des wirtsunspezifischen *Bacteroides*-Marker zu. Die wirtsspezifischen Marker weisen ein ähnliches Verhalten auf. Es ist eine Korrelation zwischen den eingesetzten MST-Markern und *E. coli* zu erkennen.

Neben den Schöpfwasserproben aus der Unterhavel (Schildhorn) wurden auch Proben aus Brunnen untersucht. Diese Uferfiltrate beinhalten je nach Witterung unterschiedliche Anteile an Fluss-/Seewasser und Grundwasser. Durch die Versickerung Richtung Brunnen wird das Oberflächenwasser teilweise gereinigt. In diesen Proben konnten entsprechend weder *E. coli*-Bakterien noch MST-Marker nachgewiesen werden (Daten vom LAGeSo). Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Aufreinigung durch die Uferfiltration einen wichtigen Beitrag zu Verbesserung der Rohwasserqualität liefert.

Zusätzlich wurden die Einflüsse auf das Rohwasser des Wasserwerks Tiefwerder großräumig betrachtet. Hierzu wurden Proben aus dem Zustrom der Unterhavel und aus dem Abstrom bis hin zur Spree untersucht.

Tabelle 5.16: Ermittelte Konzentrationen der wirtsspezifischen *Bacteroides*-Marker in Proben aus der Havel

Entnahmestelle	Probe- nahme	Bacteroides-Marker				
		Wirtsun- spezifisch	Mensch	Hund*	Wiederkäuer	Schwein
		AllBac296f/ 412r	HF183/ Bac708R	DF 475 F/ Bac708R	BacR_f/_r	Pic2 Bac 41 F/ 163 R
Kopien/mL						
Grunewaldturm	09.02.2016	1,7·10 ³	< LQ	+	< LQ	< LQ
Grunewaldturm	08.03.2016	6,4·10 ³	4,8·10 ²	+	< LQ	< LQ
Grunewaldturm	26.04.2016	1,4·10 ³	< LQ	+	< LQ	<LQ
Grunewaldturm	19.07.2016	8,1·10 ³	< LQ	+	< LQ	<LQ
Grunewaldturm	02.08.2016	3,9·10 ³	< LQ	+	< LQ	<LQ
Grunewaldturm	16.08.2016	9,6·10 ⁴	< LQ	-	< LQ	<LQ
Grunewaldturm	31.08.2015	4,6·10 ²	< LQ	-	< LQ	<LQ
Kl. Badewiese	26.04.2016	6,2·10 ²	< LQ	-	< LQ	<LQ
Kl. Badewiese	19.07.2016	1,1·10 ⁴	< LQ	+	< LQ	<LQ
Kl. Badewiese	02.08.2016	2,6·10 ³	< LQ	-	< LQ	<LQ
Kl. Badewiese	16.08.2016	4,2·10 ³	< LQ	+	< LQ	<LQ
Kl. Badewiese	24.08.2016	9,8·10 ²	< LQ	-	< LQ	<LQ
Kl. Badewiese	31.08.2015	2,7·10 ²	< LQ	-	< LQ	<LQ
Kl. Badewiese	08.09.2016	1,3·10 ²	< LQ	-	< LQ	<LQ
Schildhorn	26.04.2016	2,2·10 ³	5,9·10 ⁰	+	< LQ	<LQ
Schildhorn	19.07.2016	1,0·10 ⁴	< LQ	+	< LQ	<LQ
Schildhorn	02.08.2016	3,9·10 ⁴	< LQ	-	< LQ	<LQ
Schildhorn	16.08.2016	1,2·10 ⁴	< LQ	-	< LQ	<LQ
Schildhorn	24.08.2016	1,3·10 ⁵	< LQ	-	4,8·10 ¹	<LQ
Schildhorn	31.08.2015	7,2·10 ²	< LQ	-	< LQ	<LQ
Pichelsee	09.02.2016	4,2·10 ³	5,2·10 ²	+	5,2·10 ⁰	< LQ
Pichelsee	08.03.2016	6,4·10 ³	2,7·10 ²	+	< LQ	< LQ
Pichelsee	26.04.2016	1,7·10 ³	7,0·10 ⁰	-	< LQ	<LQ
Pichelsee	19.07.2016	1,5·10 ⁴	3,7·10 ²	+	< LQ	<LQ
Pichelsee	16.08.2016	5,2·10 ³	2,6·10 ²	-	< LQ	<LQ
Pichelsee	31.08.2015	2,5·10 ³	< LQ	+	< LQ	<LQ
Heerstraße	25.04.2016	1,3·10 ³	4,4·10 ⁰	+	< LQ	<LQ
Heerstraße	15.06.2016	1,8·10 ⁴	6,5·10 ²	+	< LQ	<LQ
Heerstraße	19.07.2016	1,5·10 ⁴	5,0·10 ²	1,2·10 ²	< LQ	<LQ
Heerstraße	19.05.2016	2,5·10 ³	< LQ	+	< LQ	<LQ
Heerstraße	02.08.2016	2,1·10 ⁴	< LQ	-	< LQ	<LQ
Heerstraße	16.08.2016	3,3·10 ³	3,0·10 ²	-	< LQ	<LQ
Heerstraße	24.08.2016	1,7·10 ⁴	4,2·10 ⁰	-	2,7·10 ¹	<LQ
Heerstraße	31.08.2015	2,1·10 ³	< LQ	-	< LQ	<LQ

* Aufgrund der Coamplifikation von unspezifischen Produkten bei niedrigen Ausgangskonzentrationen wurden positiv/negativ-Ergebnisse angegeben, wobei das Auftreten des spezifischen Amplifikats elektrophoretisch überprüft wurde. Bei höheren Kopienzahlen (> 10² Kopien/mL) war eine Quantifizierung möglich

Tabelle 5.17: Ermittelte Konzentrationen der wirtsspezifischen *Bacteroides*-Marker in Proben aus der Spree

Entnahmestelle	Probe- nahme	<i>Bacteroides</i> -Marker				
		Wirtsun- spezifisch AllBac296f/ 412r	Mensch HF183/ Bac708R	Hund* DF 475 F/ Bac708R	Wiederkäuer BacR_f/_r	Schwein Pic2 Bac 41 F/ 163 R
		Kopien/mL				
n. KW Ruhleben	25.04.2016	9,4·10 ²	< LQ	+	< LQ	<LQ
n. KW Ruhleben	19.05.2016	2,1·10 ³	< LQ	-	< LQ	<LQ
n. KW Ruhleben	15.06.2016	6,9·10 ³	4,2·10 ¹	+	< LQ	<LQ
n. KW Ruhleben	19.07.2016	1,2·10 ⁴	< LQ	+	< LQ	<LQ
n. KW Ruhleben	02.08.2016	1,7·10 ⁴	1,7·10 ²	-	< LQ	<LQ
n. KW Ruhleben	16.08.2016	1,4·10 ⁴	< LQ	+	< LQ	<LQ
n. KW Ruhleben	31.08.2015	1,7·10 ³	< LQ	-	< LQ	<LQ
n. KW Ruhleben	05.09.2016	3,9·10 ²	< LQ	-	< LQ	<LQ
n. KW Ruhleben	08.09.2016	1,2·10 ²	< LQ	-	< LQ	<LQ
Tegeler Weg	19.07.2016	1,0·10 ⁵	2,1·10 ²	+	< LQ	<LQ
Tegeler Weg	02.08.2016	1,1·10 ⁵	7,5·10 ²	-	< LQ	<LQ
Tegeler Weg	16.08.2016	4,2·10 ⁴	< LQ	-	< LQ	<LQ
Tegeler Weg	24.08.2016	1,1·10 ⁴	< LQ	-	< LQ	<LQ
Tegeler Weg	31.08.2015	3,8·10 ³	< LQ	+	< LQ	<LQ
Tegeler Weg	05.09.2016	1,1·10 ³	< LQ	-	< LQ	<LQ
Tegeler Weg	08.09.2016	2,6·10 ²	< LQ	-	< LQ	<LQ
Tegeler Weg	13.09.2016	1,1·10 ³	< LQ	-	n.a	<LQ

* Aufgrund der Coamplifikation von unspezifischen Produkten bei niedrigen Ausgangskonzentrationen wurden positiv/negativ-Ergebnisse angegeben, wobei das Auftreten des spezifischen Amplifikats elektrophoretisch überprüft wurde. Bei höheren Kopienzahlen (> 10² Kopien/mL) war eine Quantifizierung möglich

Betrachtet man die Ergebnisse von Havel und Spree, so liegt die fäkale Belastung für die verschiedenen Messstellen über den Untersuchungszeitraum auf einem einheitlichen Niveau von ca. 10⁴ Kopien/mL des wirtsunspezifischen *Bacteroides*-Markers. Insgesamt bestätigen die Ergebnisse den Einfluss von humanem Abwasser und Hundekot auf die Oberflächengewässer. Die Messstellen Kleine Badewiese und Schildhorn sind am wenigsten durch humane Fäkalien belastet.

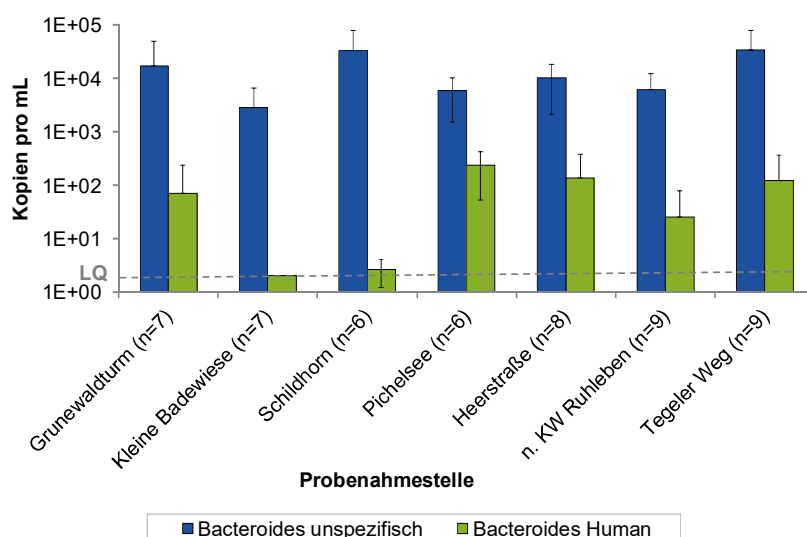


Abbildung 5.15: Durchschnittliche Konzentration des unspezifischen und humanspezifischen Markers in Proben aus Havel und Spree.

Auch für das Einzugsgebiet des Wasserwerkes Kaulsdorf wurden Grundwasser- und Oberflächenwasserproben analysiert. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmungen für die wirtsunspezifischen *Bacteroides*- und mtDNA-Marker für das urbane Einzugsgebiet dargestellt.

Tabelle 5.18: Ermittelte Konzentrationen der wirtsunspezifischen *Bacteroides*- und mtDNA Marker in Proben aus dem Einzugsgebiet Kaulsdorf.

Probennahme	Grundwasser				Oberflächenwasser	
	Galerie Nord Brunnen 2		Galerie Süd Brunnen 8		Habermannsee	
	<i>Bacteroides</i>	mtDNA	<i>Bacteroides</i>	mtDNA	<i>Bacteroides</i>	mtDNA
Kopien/mL						
08.07.2015	< LQ	< LQ	<LQ	< LQ	$6,1 \cdot 10^2$	< LQ
15.07.2015	< LQ	$1,7 \cdot 10^1$	< LQ	< LQ	$3,1 \cdot 10^2$	< LQ
22.07.2015	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	$2,8 \cdot 10^2$	< LQ
29.07.2015	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	$8,3 \cdot 10^2$	< LQ
05.08.2015	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	$5,6 \cdot 10^1$	< LQ
12.08.2015	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	$1,3 \cdot 10^2$	< LQ
19.08.2015	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	$6,2 \cdot 10^1$	< LQ
25.08.2015	< LQ	< LQ	$1,2 \cdot 10^1$	< LQ	$4,7 \cdot 10^2$	< LQ
02.09.2015	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	$4,4 \cdot 10^2$	< LQ
10.09.2015	< LQ	< LQ	< LQ	$6,6 \cdot 10^0$	$1,2 \cdot 10^2$	< LQ
16.09.2015	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	$5,6 \cdot 10^2$	< LQ
23.09.2015	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	$7,8 \cdot 10^1$	< LQ
30.09.2015	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	$1,9 \cdot 10^2$	< LQ
07.10.2015	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	$2,3 \cdot 10^2$	< LQ
14.10.2015	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	$3,6 \cdot 10^2$	< LQ
21.10.2015	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	$2,1 \cdot 10^2$	< LQ
28.10.2015	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	$7,1 \cdot 10^2$	< LQ
04.11.2015	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	$7,1 \cdot 10^1$	< LQ

Die gemessenen Konzentrationen des allgemeinen *Bacteroides*-Markers lagen für die Proben aus dem Oberflächenwasser zwischen $5,6 \cdot 10^1$ und $7,1 \cdot 10^2$ Kopien/mL. Dies zeigt eine geringe Belastung an. Die Werte sind über den Untersuchungszeitraum konstant. Da alle Proben eine fäkale Kontamination aufwiesen, wurden alle Proben aus dem Kaulsdorfer See auf spezifische *Bacteroides*-Marker untersucht.

In Tabelle 5.18 sind die Ergebnisse der Analyse von wirtsspezifischen *Bacteroides*-Markern in Uferfiltraten/Grundwässern, gewonnen über den Brunnen 2 der Galerie Nord und Brunnen 8 der Galerie Süd sowie in Schöpfproben aus dem Habermannsee, dargestellt. Es konnte zu keinem Zeitpunkt eine signifikante fäkale Beeinflussung des Uferfiltrats/Grundwassers festgestellt werden. Dies bestätigten auch die Ergebnisse aus den Kulturverfahren (durchgeführt vom LAGeSo). Es wurden keine *E. coli*-Bakterien, Enterokokken oder somatischen Coliphagen in diesen Proben detektiert. Die Gesamtkeimzahl bei 22 °C lag zwischen 0 und 2 KBE/mL. Aus diesem Grund wurden die Proben nicht auf wirtsspezifische Marker untersucht.

Tabelle 5.19: Ermittelte Konzentrationen der Indikatorbakterien (ermittelt vom LAGeSo) und *Bacteroides*-Marker in Proben aus der Brunnengalerie Kaulsdorf und dem Habermannsee.

Proben- nahme	Indikatorbakterien		<i>Bacteroides</i> -Marker				
	<i>E. coli</i>	Entero- kokken	Unspezi fisch	Mensch	Hund*	Wieder- käufer	Schwein
			AllBac296f/ 412r	HF183/ Bac708R	DF 475 F/ Bac708R	BacR_f/_r	Pic2 Bac 41 F/ 163 R
			Bakterien/100 mL		Kopien/mL		
08.07.2015	16,4	5	6,1·10 ²	< LQ	-	< LQ	< LQ
15.07.2015	34,4	6	3,1·10 ²	< LQ	+	< LQ	< LQ
22.07.2015	15	<15	2,8·10 ²	< LQ	+	< LQ	< LQ
29.07.2015	<15	<15	8,3·10 ²	< LQ	2,2·10 ²	< LQ	< LQ
05.08.2015	15	<15	5,6·10 ¹	< LQ	5,8·10 ²	< LQ	< LQ
12.08.2015	<15	<15	1,3·10 ²	< LQ	1,3·10 ²	< LQ	< LQ
19.08.2015	<15	<15	6,2·10 ¹	< LQ	1,7·10 ²	< LQ	< LQ
25.08.2015	15	15	4,7·10 ²	6,9·10 ⁰	1,0·10 ²	< LQ	< LQ
02.09.2015	30	<15	4,4·10 ²	6,8·10 ⁰	1,9·10 ²	< LQ	< LQ
10.09.2015	<15	<15	1,2·10 ²	< LQ	-	< LQ	< LQ
16.09.2015	15	<15	5,6·10 ²	6,8·10 ⁰	2,3·10 ²	< LQ	< LQ
23.09.2015	44	39	7,8·10 ¹	< LQ	2,1·10 ²	< LQ	< LQ
30.09.2015	<15	<15	1,9·10 ²	< LQ	5,2·10 ²	< LQ	< LQ
07.10.2015	30	<15	2,3·10 ²	< LQ	2,3·10 ²	< LQ	< LQ
14.10.2015	<15	<15	3,6·10 ²	< LQ	-	< LQ	< LQ
21.10.2015	<15	15	2,1·10 ²	< LQ	2,7·10 ²	< LQ	< LQ
28.10.2015	30	292	7,1·10 ²	< LQ	2,3·10 ²	< LQ	< LQ
04.11.2015	<15	<15	7,1·10 ¹	< LQ	+	< LQ	< LQ
08.07.2015	16,4	5	6,1·10 ²	< LQ	-	< LQ	< LQ
15.07.2015	34,4	6	3,1·10 ²	< LQ	+	< LQ	< LQ
22.07.2015	15	<15	2,8·10 ²	< LQ	+	< LQ	< LQ

* Aufgrund der Coamplifikation von unspezifischen Produkten bei niedrigen Ausgangskonzentrationen wurden positiv/negativ-Ergebnisse angegeben, wobei das Auftreten des spezifischen Amplifikats elektrophoretisch überprüft wurde. Bei höheren Kopienzahlen ($> 10^2$ Kopien/mL) war eine Quantifizierung möglich

Der humanspezifische Marker war nur selten nachweisbar. Eine fäkale Kontamination humanen Ursprungs konnte nur im August und zweimal im September mit einer sehr geringen Konzentration von ca. 10^0 Kopien/mL ermittelt werden. Der Hunde-spezifischen Marker konnte sehr häufig nachgewiesen werden. Sowohl der Wiederkäuer-spezifische als auch der Schweine-spezifische Marker wurden nicht detektiert.

Als mögliche Kontaminationsquellen des Kaulsdorfer Sees kommen nach Informationen des Wasserversorgungsunternehmens Hunde, Menschen (Badebetrieb im Sommer) und Rot-/Schwarzwild in Frage. Die Ergebnisse der spezifischen Untersuchungen lassen Rückschlüsse auf fäkale Kontaminationen durch Hunde zu. Zu fast allen Zeitpunkten konnte der Hunde-spezifische Marker nachgewiesen werden. Im Großteil der Proben lagen die Konzentrationen der Hund-spezifischen Marker auf dem Niveau der Gesamtkontamination. In manchen Fällen wurden sogar höhere Hunde-spezifische Konzentrationen gemessen als mit dem allgemeinen *Bacteroides*-Marker. Da diese Unterschiede eher gering sind, lässt sich dies auf die Messungenauigkeit der qPCR-Methodik zurückführen (Wang et al., 2010). Für die Beeinflussung der mikrobiologischen Wasserqualität des Sees durch menschliche Fäkalien gibt es durch die PCR-Untersuchungen kaum Belege. Für den Fall, dass entsprechende Marker nachgewiesen wurden, war deren Konzentration gering. Für Rot- und Schwarzwild konnten im Rahmen des Projektes keine PCR-basierten MST-Methoden etabliert werden.

Wenn man die allgemeine Belastung der beiden Oberflächengewässer Kaulsdorfer See (Kaulsdorf) und die Unterhavel (Tiefwerder) vergleicht, so ist die Unterhavel mit Konzentrationen von bis zu 10^4 Kopien/mL deutlich stärker belastet als der Kaulsdorfer See (10^1 - 10^2 Kopien/mL). Als Vergleichsparameter für die molekularen Untersuchungen wurden die extern bestimmten Konzentrationen von *E. coli* herangezogen. Diese wurden mittels MPN-Verfahren erfasst. Die nachgewiesenen Konzentrationen an *E. coli* blieben im Kaulsdorfer See von Juli bis Oktober 2015 weitestgehend konstant, dies spiegelt sich auch in den konstanten Konzentrationen des wirtsunspezifischen *Bacteroides*-Markers wider.

Hunde-spezifische Marker wurden im Ausland bereits zur Identifizierung fäkaler Einträge in Oberflächengewässern genutzt. In einer Vielzahl dieser Studien spielten Kontaminationen durch Hunde nur eine untergeordnete Rolle. So wurden z. B. am Sunnyside Beach in Kanada (Staley und Edge, 2016) und Flüssen bzw. Flussmündungen an der kalifornischen Küste (Schriewer et al., 2010) keine oder nur geringe Konzentrationen an Hunde-spezifischen *Bacteroides*-Markern detektiert. Einige Studien belegen jedoch, dass Hundekot einen negativen Einfluss auf die Wasserqualität haben kann. Hier sind Untersuchungen am Fluss Humber in Kanada (Staley und Edge, 2016), an den Seen Buckeye, Atwood und Tappan in Ohio (Francy und Stelzer, 2012) sowie einem Einzugsgebiet an der Küste von Santa Barbara, Kalifornien (Ervin et al., 2014) zu nennen. Die kalifornische Studie kommt zu dem Schluss, dass durch entsprechende Managementmaßnahmen, wie die Schulung der Anwohner in Hinblick auf die ordnungsgemäße Entsorgung der Hinterlassenschaften ihrer Haustiere, der Eintrag von Hundefäkalien in die Oberflächenwässer minimiert werden kann. Diese Managementmaßnahmen können auch auf die städtisch-geprägten Einzugsgebiete, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, übertragen werden. Hier ist die Sensibilisierung der Hundehalter, z. B. über Plakate oder Flyer, denkbar.

Außerdem könnte das Aufstellen von Hundekottütenspendern zu einer Verbesserung der Wasserqualität beitragen.

5.3.3 Talsperren Herbringhausen und Kerspe

Neben den urbanen Einzugsgebieten Kaulsdorf und Tiefwerder wurden auch die ländlich geprägten Talsperreneinzugsgebiete Herbringhausen und Kerspe in die Untersuchungen einbezogen. Die Untersuchungsergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 5.20: Ermittelte Konzentrationen der *Bacteroides*-Marker für Proben aus dem Einzugsgebiet Herbringhausen

Probennahmestelle	Datum	<i>E. coli</i>	<i>Bacteroides</i> -Marker				
			Unspezi- fisch	Mensch	Hund*	Wieder- käufer	Schwein
			AllBac296f/ 412r	HF183/ Bac708R	DF 475 F/ Bac708R	BacR_f/ _r	Pic2 Bac 41 F/ 163 R
		KBE/ 100 mL	Kopien/mL				
Untergarschagen 1	10.08.2015	$1,9 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^1$	< LQ	-	< LQ	< LQ
Untergarschagen 2	10.08.2015	$3,0 \cdot 10^2$	$1,1 \cdot 10^2$	< LQ	-	< LQ	< LQ
Herbringhauser Bach 1	10.08.2015	$2,4 \cdot 10^2$	$7,5 \cdot 10^1$	< LQ	-	< LQ	< LQ
Herbringhauser Bach 2	10.08.2015	$2,3 \cdot 10^1$	$8,3 \cdot 10^0$	< LQ	+	< LQ	< LQ
Untergarschagen 1	19.10.2015	$1,6 \cdot 10^1$	$1,1 \cdot 10^2$	< LQ	+	< LQ	< LQ
Untergarschagen 2	19.10.2015	$1,3 \cdot 10^1$	$5,7 \cdot 10^2$	< LQ	+	$7,2 \cdot 10^0$	< LQ
Herbringhauser Bach 1	19.10.2015	$5,2 \cdot 10^0$	$1,2 \cdot 10^2$	< LQ	+	< LQ	< LQ
Herbringhauser Bach 2	19.10.2015	$3,6 \cdot 10^1$	$4,9 \cdot 10^2$	< LQ	+	< LQ	< LQ

* Aufgrund der Coamplifikation von unspezifischen Produkten bei niedrigen Ausgangskonzentrationen wurden positiv/negativ-Ergebnisse angegeben, wobei das Auftreten des spezifischen Amplifikats elektrophoretisch überprüft wurde. Bei höheren Kopienzahlen ($> 10^2$ Kopien/mL) war eine Quantifizierung möglich

Die Konzentration der Art-unspezifischen mtDNA-Marker lag für alle Proben unterhalb dem LQ (Daten nicht gezeigt). Der allgemeine Marker für die 16S rDNA der Gattung *Bacteroides* konnte in allen untersuchten Proben nachgewiesen und auch quantifiziert werden. Insgesamt konnte an beiden Zeitpunkten in allen untersuchten Zuläufen ein Art-unspezifischer, fäkaler Einfluss festgestellt werden. Dies spiegelt sich auch in den *E. coli*-Zahlen wider.

Die Untersuchung auf wirtsspezifische Sequenzen zeigte einen Eintrag von Hundefäkalien, wobei dieser Eintrag im Oktober deutlich ausgeprägter ist. Dies könnte daran liegen, dass die Fäkalbakterien bei niedrigeren Herbsttemperaturen länger stabil sind als bei den hohen Temperaturen im Sommer. In einer Probe wurden Wiederkäuer-spezifische *Bacteroides*-Marker detektiert, wobei die Konzentration mit $7,2 \cdot 10^0$ Kopien pro mL nur knapp über dem LQ lag. Schweine-spezifische DNA-Sequenzen konnten nicht nachgewiesen werden.

Auch an der Talsperre Kerspe konnte zu allen Zeitpunkten an allen untersuchten Zuläufen ein nicht spezifizierbarer fäkaler Einfluss festgestellt werden. Im Gegensatz zur Talsperre Herbringhausen erreichte der wirtsunspezifische Marker an der Talsperre Kerspe allerdings wesentlich höhere Kopienzahlen.

Tabelle 5.21: Ermittelte Konzentrationen der *Bacteroides*-Marker für Proben aus dem Einzugsgebiet Kerspe

Probennahme- stelle	Datum	<i>E. coli</i>	<i>Bacteroides</i> -Marker				
			Unspezi- fisch	Mensch	Hund*	Wieder- käufer	Schwein
			AllBac296f/ 412r	HF183/ Bac708R	DF 475 F/ Bac708R	BacR_f/ _r	Pic2 Bac 41 F/ 163 R
		Bakterien/ 100 mL	Kopien/mL				
Kerspebach	10.08.2015	$> 3,0 \cdot 10^2$	$4,7 \cdot 10^2$	$5,7 \cdot 10^1$	-	< LQ	< LQ
Vor den Eicken	10.08.2015	$> 3,0 \cdot 10^2$	$2,0 \cdot 10^3$	< LQ	+	$3,7 \cdot 10^1$	< LQ
Blankenbach	10.08.2015	$> 3,0 \cdot 10^2$	$4,3 \cdot 10^2$	< LQ	+	$6,5 \cdot 10^1$	< LQ
Bommerter Bach	10.08.2015	$> 3,0 \cdot 10^2$	$6,3 \cdot 10^2$	< LQ	-	$2,5 \cdot 10^1$	< LQ
Padberg	10.08.2015	$> 3,0 \cdot 10^2$	$1,9 \cdot 10^3$	< LQ	+	< LQ	< LQ
Nieder-Hedfeld	10.08.2015	$> 3,0 \cdot 10^2$	$1,7 \cdot 10^5$	$4,4 \cdot 10^1$	+	$2,4 \cdot 10^3$	< LQ
Kerspebach	19.10.2015	$< 1,0 \cdot 10^0$	$1,8 \cdot 10^2$	< LQ	+	< LQ	< LQ
Vor den Eicken	19.10.2015	$4,6 \cdot 10^1$	$1,2 \cdot 10^3$	$5,8 \cdot 10^1$	+	$6,5 \cdot 10^0$	< LQ
Blankenbach	19.10.2015	$2,0 \cdot 10^1$	$8,8 \cdot 10^2$	< LQ	+	< LQ	< LQ
Bommerter Bach	19.10.2015	$5,8 \cdot 10^1$	$8,8 \cdot 10^2$	< LQ	+	$1,9 \cdot 10^1$	< LQ
Padberg	19.10.2015	$4,7 \cdot 10^1$	$4,5 \cdot 10^2$	< LQ	+	$2,3 \cdot 10^1$	< LQ
Nieder-Hedfeld	19.10.2015	$1,5 \cdot 10^2$	$3,0 \cdot 10^2$	< LQ	+	< LQ	< LQ

* Aufgrund der Coamplifikation von unspezifischen Produkten bei niedrigen Ausgangskonzentrationen wurden positiv/negativ-Ergebnisse angegeben, wobei das Auftreten des spezifischen Amplifikats elektrophoretisch überprüft wurde. Bei höheren Kopienzahlen ($> 10^2$ Kopien/mL) war eine Quantifizierung möglich

In einem Großteil der Proben (58 %) konnten Wiederkäuer-spezifische Sequenzen quantitativ nachgewiesen werden. In einer Probe wurde sogar eine auffällig hohe Kopienzahl des Wiederkäuer-spezifischen Markers detektiert. In dieser Probe lag die Konzentration des wirtsunspezifischen Markers ebenfalls um ca. 2 Log-Stufen höher als in den anderen Proben. *Bacteroides*-Sequenzen, die spezifisch für Schweine sind, konnten nur in einer der Proben nachgewiesen werden. Fast alle Proben waren positiv für den Hunde-spezifischen Marker (83 %). Humanspezifische Sequenzen wurden nur in 25 % der Proben nachgewiesen, wobei die Kopienzahlen gering waren. Dass einige Zuflüsse der Talsperre Abwassereinflüssen unterliegen, wird auch durch die Ergebnisse chemisch-analytischer Untersuchungen bestätigt. So wurden in den Messstellen Vor den Eicken, Kerspebach und Bommerter Bach im Juli 2015 Koffein nachgewiesen.

Die beiden Talsperren, die zur Trinkwassergewinnung verwendet werden, besitzen unterschiedliche Zuflüsse. In die Untersuchungen wurden Zuflüsse einbezogen, bei denen in früheren Untersuchungen auffällig hohe Bakterienzahlen oder chemische Marker wie Koffein nachgewiesen werden konnten. Aus dem Vergleich der Konzentrationen, die sich durch den allgemeinen *Bacteroides*-Marker ergaben, ist zu erkennen, dass die Talsperre Kerspe stärker belastet ist als die Talsperre Herbringhamen. Dies bestätigen auch die ermittelten Konzentrationen an *E. coli*.

An beiden Talsperren war die mikrobielle Belastung im August höher als im Oktober. Die *E. coli*-Konzentrationen der Talsperre Kerspe lagen im Sommer sogar deutlich oberhalb der Erwartungen, so dass sie aufgrund der begrenzten Anzahl an Verdünnungen, die im Kulturverfahren

angesetzt wurden, keine quantitativen Werte erfasst werden konnten. Diese höhere Belastung könnte durch ein Regenereignis und den damit verbundenen Oberflächenabfluss begründet sein.

In Herbringhamen konnten Hunde als Kontaminationsquelle identifiziert werden, wobei humanspezifische Marker an keiner Stelle nachgewiesen wurden. Der Hunde-spezifische Marker konnte allerdings nur in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden.

Auch im Einzugsgebiet der Talsperre Kerspe scheint der Eintrag von Hundekot einen Einfluss auf die Wasserqualität zu haben. Außerdem konnten Kontaminationen durch Rindergülle belegt werden. Dabei sind die Ergebnisse für eine Probe besonders auffällig (11.08.2015, Nieder-Hedfeld). Hier konnte eine sehr hohe Gesamtkontamination gemessen werden, welche sich vor allem im Wiederkäuer-spezifischen Markern und zum Teil im Schweine-spezifischen Marker widerspiegelt. Der Nachweis dieser Marker in Kombination weist auf Gülle-Düngung hin. Als entsprechende Managementmaßnahme ist deshalb die weitere Einschränkung bzw. die Optimierung der Gülleausbringung denkbar.

In den vergangenen Jahren wurde auf internationaler Ebene bereits eine Vielzahl von MST-Studien durchgeführt, bei denen *Bacteroidales*-basierte PCR-Methoden erfolgreich zur Identifizierung von fäkalen Einträgen in Oberflächengewässern eingesetzt wurden (z. B. Marti et al., 2013; Mieszkina et al., 2009; Ohad et al., 2015). In Deutschland finden solche Methoden bislang keine Anwendung. Die Ergebnisse zu den Talsperren der WSW Energie & Wasser AG, aber auch die Erkenntnisse aus den anderen Untersuchungsgebieten, zeigen die Praxistauglichkeit und das Potenzial der molekularbiologischen Datenbank-unabhängigen MST-Methoden.

5.4 Einsatz von Microbial Source Tracking-Methoden zur Identifizierung der Herkunft von Antibiotikaresistenzen

Aufgrund alarmierender Berichte der WHO haben in den letzten Jahren Antibiotikaresistenzen als Untersuchungsparameter für die mikrobiologische Wasserqualität zunehmend an Bedeutung gewonnen (siehe Kapitel 1.3). Ein wichtiger Schritt um die Ausbreitung von Antibiotikaresistenzdeterminanten in der Umwelt besser zu verstehen und auch zu verhindern, ist die Identifikation ihrer Eintragswege. Aus diesem Grund wurden am Tai-See sowohl Untersuchungen zum Vorkommen von Antibiotikaresistenzgenen als auch MST-Markern durchgeführt.

Über das Vorhandensein von Antibiotikaresistenzgenen im Tai-See ist bislang noch wenig bekannt. Im Rahmen dieser Studie wurde für eine vergleichende Betrachtung über einen Zeitraum von zwei Jahren fünf Antibiotikaresistenzgene ausgewählt. Hierzu zählt das Sulfonamid-Resistenzgen *sul1*, das eines der am meisten untersuchten Antibiotikaresistenzgene in der aquatischen Umwelt ist, und als möglicher Indikator für die Beurteilung der Belastung durch Antibiotikaresistenzen in der Umwelt vorgeschlagen wird (Berendonk et al., 2015). Zusätzlich wurden vier klinisch relevante Antibiotikaresistenzgene quantifiziert: Die β -Lactamase-Gene *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-32} und *bla*_{NDM-1} sowie das Colistin-Resistenzgen *mcr-1*. Mit *bla*_{NDM-1} und *mcr-1*

wurden Antibiotikaresistenzgene berücksichtigt, die eine Resistenz gegen Reserveantibiotika vermitteln, und erst vor wenigen Jahren zum ersten Mal beschrieben wurden. Darüber hinaus wurde die Identifizierung potenzieller Eintragsquellen über MST-Verfahren in die Untersuchungen einbezogen.

Abbildung 5.16 fasst die Verteilung der ausgewählten Antibiotikaresistenzgene in Wasser- und Sedimentproben aus verschiedenen Bereichen des Sees zusammen. Zusätzlich ist die relative Abundanz bezogen auf die 16S rRNA Genkopien dargestellt.

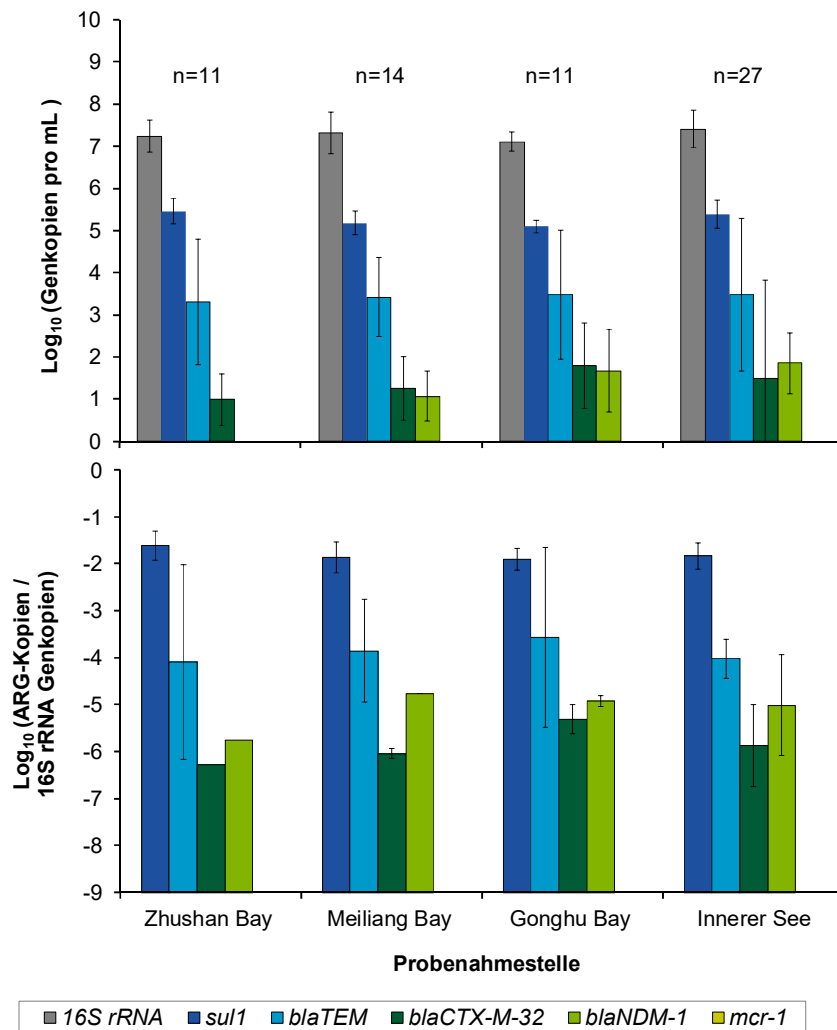


Abbildung 5.16: Absolute (oben) und relative (unten) Abundanz der untersuchten Antibiotikaresistenzgene (ARG) in Wasserproben aus verschiedenen Bereichen des Tai-Sees. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen.

Das Sulfonamid-Resistenzgen *sul1* konnte in allen untersuchten Wasserproben nachgewiesen werden, wobei die Konzentration zwischen $1,9 \cdot 10^3$ und $7,9 \cdot 10^5$ Kopien pro mL Wasser lag. Das Gen *sul1* kodiert für eine Resistenz-vermittelnde Dihydropteroatsynthase und ist im Allgemeinen mit Integrons der Klasse I assoziiert (Sköld, 2000). Klasse-I-Integrone zählen zu den mobilen genetischen Elementen und sind gute Indikatoren für einen horizontalen Gentransfer. Frühere Studien haben gezeigt, dass das *sul1*-Gen eines der häufigsten Antibiotikaresistenzgene in der

Umwelt ist (Jiang et al., 2013; Xiong et al., 2015). Hintergründe der weiten Verbreitung ist die Assoziation mit Integrons der Klasse I sowie die massive Nutzung von Sulfonamiden in China (Zhang et al., 2015). 2013 wurden in China rund 7.890 Tonnen Sulfonamide eingesetzt (Zhang et al., 2015).

Im Vergleich zu *sul1* betrug die Nachweishäufigkeit des Gens *bla*_{TEM} nur 67,1 % für die Wasserproben. Darüber hinaus war die Konzentration an *bla*_{TEM} im Vergleich zu *sul1* signifikant geringer ($2,9 \cdot 10^0$ - $4,5 \cdot 10^4$ Kopien pro mL Wasser). Das *bla*_{TEM}-Gen kodiert für eine TEM- β -Lactamase, die Resistenz gegen β -Lactam-Antibiotika wie Penicilline und Cephalosporine vermittelt, und ist für einen Großteil der Ampicillin-Resistenzen in *E. coli* und in *Klebsiella pneumoniae* verantwortlich (Poole, 2004). Das Gen *bla*_{TEM} gilt auch als Vorläufer von Breitspektrum β -Lactamasen (Extended-Spectrum- β -Lactamasen/ ESBL; (Emery und Weymouth, 1997). Die Produktion von ESBL ist ein Mechanismus, der Resistenzen gegen Cephalosporine der dritten Generation (z. B. Cefotaxim, Ceftazidim) und Monobactame (z. B. Aztreonam) vermittelt (Rawat und Nair, 2010). Daten aus 2013 belegen, dass in China mehr als 22.300 Tonnen β -Lactam-Antibiotika für die Anwendung bei Mensch und Tier eingesetzt werden (Zhang et al., 2015). Die Ergebnisse mehrerer Studien zeigen die weltweite Verbreitung von *bla*_{TEM}-Genen in der aquatischen Umwelt (Hu et al., 2008; Jiang et al., 2013).

Neben *bla*_{TEM} wurde auch das Auftreten der β -Lactamase-Gene *bla*_{CTX-M-32} und *bla*_{NDM-1} erfasst. Das Gen *bla*_{CTX-M-32} wurde in Wasserproben (13,4 %) mit einer durchschnittlichen Konzentration von $2,3 \cdot 10^1$ Kopien pro mL nachgewiesen, während *bla*_{NDM-1} in 7,3 % der Proben mit einer durchschnittlichen Genkopienzahl von $3,2 \cdot 10^1$ pro mL Wasser detektiert werden konnte. Inzwischen zählen β -Lactamasen des Typs CTX-M in vielen Ländern zu den relevantesten ESBL und lösen damit die klassischen β -Lactamasen des Typs TEM und SHV ab (Munday et al., 2004). Die β -Lactamase CTX-M-32 wurde zum ersten Mal in *Enterobacteriaceae*-Isolaten aus Nordspanien gefunden und scheint vor allem in Spanien verbreitet zu sein (Cartelle et al., 2004). Über die Verteilung von *bla*_{CTX-M}-Genen in anderen Ländern, und insbesondere in der aquatischen Umwelt, ist bislang noch wenig bekannt. 2012 konnten verschiedene Genvarianten des CTX-M-Typs, einschließlich *bla*_{CTX-M-32}, in Cefotaxim-resistenten Bakterien nachgewiesen werden, die aus dem Vouga-Flussbecken in Zentralportugal isoliert wurden (Tacão et al., 2014). Und eine kürzlich durchgeführte Studie zeigte das Vorkommen hoher Abundanzen an *bla*_{CTX-M-32} in deutschen Kläranlagen (Hembach et al., 2017). Die Ergebnisse unserer Untersuchungen belegen, dass das ESBL-Gen *bla*_{CTX-M-32} auch im Taihu auftritt, wenn auch mit geringer Nachweishäufigkeit und in niedriger Genkopienzahl.

Mit *bla*_{NDM-1} umfassten die Untersuchungen auch ein Carbapenem-Resistenzgen. Carbapeneme sind Reserveantibiotika, die zur Behandlung von Infektionen mit ESBL-produzierenden Bakterien eingesetzt werden. In den letzten Jahren wurde weltweit das zunehmende Auftreten von Bakterien mit Plasmid-kodierten Metallo- β -Lactamasen mit Carbapenemase-Aktivität beobachtet. Zu diesen Metallo- β -Lactamasen mit Carbapenemase-Aktivität zählt auch NDM-1. NDM-1 ist eine Carbapenemase, die erst vor kurzem entdeckt wurde, und sich schnell von ihrem Ursprung in Indien in den Rest der Welt ausgebreitet hat (Bushnell et al., 2013; Yong et al., 2009). Bis vor wenigen Jahren wurden NDM-1-positive Bakterien nur im klinischen Bereich gefunden (Yong et al., 2009). Aber eine Studie in Indien hat gezeigt, dass resistente Organismen und das *bla*_{NDM-1}-

Gen auch in Umweltproben (z. B. Sickerwasser) auftreten können (Walsh et al., 2011). Über die Verbreitung dieses Gens in Oberflächengewässern anderer Länder gibt es bislang nur wenige Daten. In Bezug auf den klinischen Bereich wurde die Ausbreitung von NDM-1-produzierenden *Enterobacteriaceae* (hauptsächlich *K. pneumoniae* und *E. coli*) von Indien, Pakistan und dem Vereinigten Königreich ausgehend in anderen Ländern auf allen Kontinenten beobachtet (Rolain et al., 2010). Dies führte wahrscheinlich auch zur Verbreitung von *bla*_{NDM-1} in Oberflächengewässern auf der ganzen Welt. Tatsächlich konnte das Gen *bla*_{NDM-1} im Tai-See nachgewiesen werden.

Colistin gilt aufgrund der Zunahme von Infektionen, die durch Carbapenem-resistente *Enterobacteriaceae* verursacht werden, als ein wichtiges Reserveantibiotikum (Liu et al., 2016). Seit den ersten Berichten über Colistin-Resistenzen in China im Jahr 2015 (Liu et al., 2016) wurde das Plasmid-kodierte Colistin-Resistenzgen *mcr-1* in Bakterien nachgewiesen, die in verschiedenen Ländern aus menschlichen und tierischen Proben isoliert wurden (Arcilla et al., 2016; Olaitan und Li, 2016; Wang et al., 2018). Das Auftreten von Colistin-resistenten Bakterien und *mcr-1* wurde für Abwasser und Kläranlagenablauf (Caltagirone et al., 2017; Hembach et al., 2017; Ovejero et al., 2017), Oberflächenwässer in der Schweiz, Italien, Spanien und China (Caltagirone et al., 2017; Ovejero et al., 2017; Yang et al., 2017a; Zurfuh et al., 2016), sowie Brunnenwässer in Italien und China (Caltagirone et al., 2017; Sun et al., 2017) beschrieben. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde das *mcr-1*-Gen im Fluss Haihe in China in einem Konzentrationsbereich von $3,0 \cdot 10^3$ bis $3,8 \cdot 10^5$ Genkopien pro L quantifiziert (Yang et al., 2017a). Für den Tai-See ergab sich ein anderes Bild, hier konnte das Gen *mcr-1* nicht nachgewiesen werden. Für den Nachweis von *mcr-1* im Fluss Haihe wurden 10-L-Wasserproben gefiltert (Yang et al., 2017a), während das maximale Wasservolumen in unseren Untersuchungen auf 1 L begrenzt war, da ansonsten eine Verblockung der Membran auftrat.

Betrachtet man die Ergebnisse in einem räumlichen und zeitlichen Kontext, so konnten nahezu keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Bereichen im See und den unterschiedlichen Probennahmekampagnen beobachtet werden.

In Bezug auf die verschiedenen Probennahmezeiten zeigten die absoluten und relativen Abundanzen der Antibiotikaresistenzgene nur geringfügige Abweichungen (siehe Abbildung 5.17). Der Taihu liegt in der ostasiatischen Monsun-Klimazone. In der Regenzeit von Mai bis September fallen etwa 60 % des jährlichen Niederschlags an. Wasserproben wurden sowohl während der trockenen als auch in der nassen Jahreszeit genommen und analysiert. Es wurde geprüft, ob die Jahreszeit einen Einfluss auf die Wasserqualität hat. Der hohe Niederschlag während der Regenzeit kann entweder die Belastung durch Verdünnung verringern oder die Wasserqualität des Reservoirs aufgrund eines erhöhten Oberflächenabflusses verschlechtern. Es wurde jedoch kein Einfluss der saisonalen Bedingungen auf die Konzentration der Antibiotikaresistenzgene im See festgestellt.

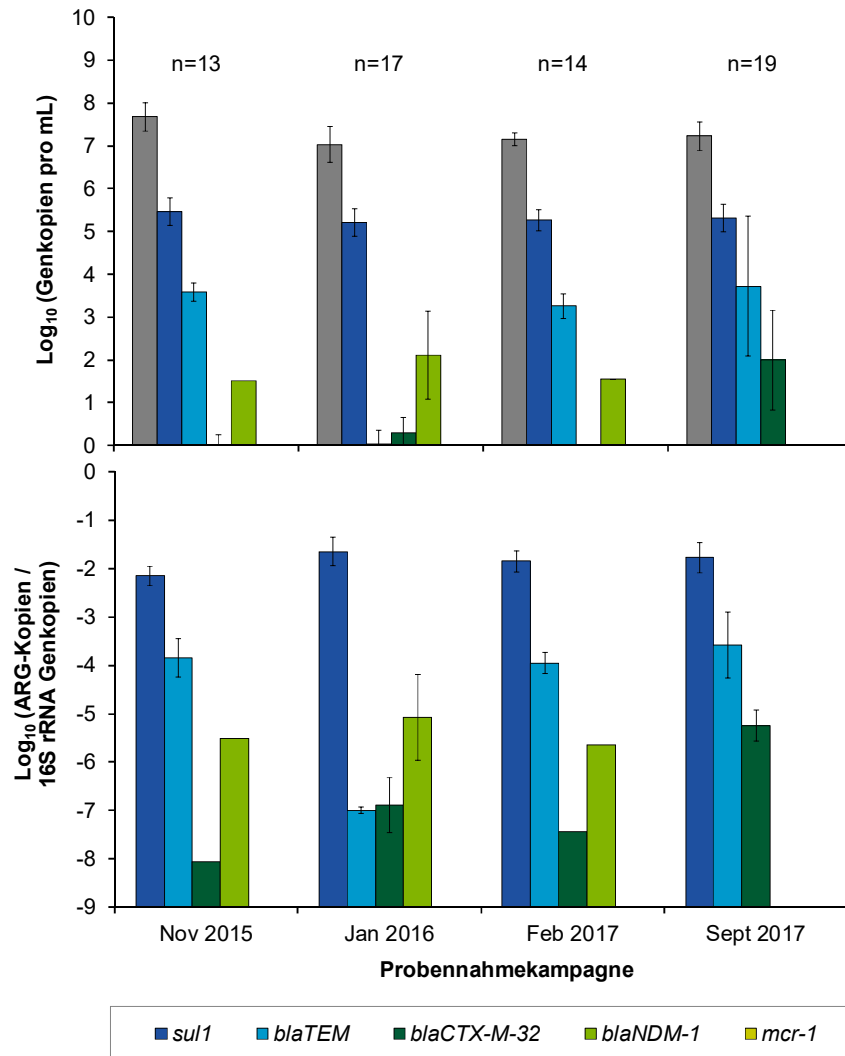


Abbildung 5.17: Absolute (links) und relative (rechts) Abundanzen der untersuchten Antibiotikaresistenzgene in Wasserproben zu den unterschiedlichen Untersuchungszeiträumen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen.

Die hier erzielten Ergebnisse, die eine weite Verbreitung von Antibiotika-Resistenzgenen im Taihu zeigen, sind im Einklang mit Daten aus der Literatur: Bis zu 63 % der in 2011 aus dem Taihu gewonnenen Bakterien-Isolate zeigten eine Resistenz gegen Streptomycin (Aminoglycosid). Ähnlich hoch waren die Werte für eine Resistenz gegen Ampicillin (β -Laktam-Antibiotika), gefolgt von Resistenzen gegen Tetracycline und Chloramphenicol (Yin et al., 2013). Zhang et al. (2009a) wiesen Klasse-I-Integronase-Gene (10^3 Kopien pro mL) und die Tetracyclin-Resistenzgene *tet(A)* (10^4 - 10^5 Kopien pro mL) und *tet(C)* (10^5 Kopien pro mL) im Tai-See nach. Auch Wang et al. (2016) haben das Auftreten von 17 verschiedenen Antibiotikaresistenzgenen und drei Integronase-Genen in Gesamt-DNA-Extrakten (Sediment und Wasser) und in bakteriellen Isolaten aus dem Taihu untersucht. Sie zeigten die Verbreitung der Gene *tet(C)*, *tet(G)*, *sul1*, *sul2* und *bla_{OXA-1}* im See (Wang et al., 2016). Abgesehen von der begrenzten Anzahl von Proben (23 Wasser- und 19 Sedimentproben) und den Unterschieden im Spektrum der Antibiotikaresistenzgene liefert diese Studie jedoch keine quantitativen Daten. Diese Wissenslücke wurde durch die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit geschlossen. Darüber

hinaus hat sich diese Studie auf klinisch relevante Antibiotikaresistenzgene konzentriert, die sich erst vor kurzem entwickelt haben. Ein Vergleich der Antibiotikaresistenzgen-Konzentrationen im Tai-See mit denen anderer Oberflächenwasserkörper zeigte, dass die Antibiotikaresistenzgen-Belastung des Sees auf dem gleichen bzw. einem niedrigeren Niveau liegt (siehe Tabelle 10.15).

Antibiotikaresistenzgene und antibiotikaresistente Bakterien gelangen zum einen über Abwässer in die Umwelt, zum anderen können sie auch über den Oberflächenabfluss landwirtschaftlicher Flächen in Oberflächengewässer eingetragen werden. Die Wasserqualität im Taihu wird durch verschiedene Faktoren bedroht. Insbesondere Vieh-, Geflügel- und Schweinefarmen rund um den See, aber auch industrielles und kommunales Abwasser werden als relevante Eintragsquellen angesehen (Zhang et al., 2012). Um die fäkale Belastung des Sees zu erfassen und gegebenenfalls ihren Ursprung und damit auch den Ursprung der antibiotikaresistenten Bakterien und Antibiotikaresistenzgene zu identifizieren, wurden MST-Methoden angewandt.

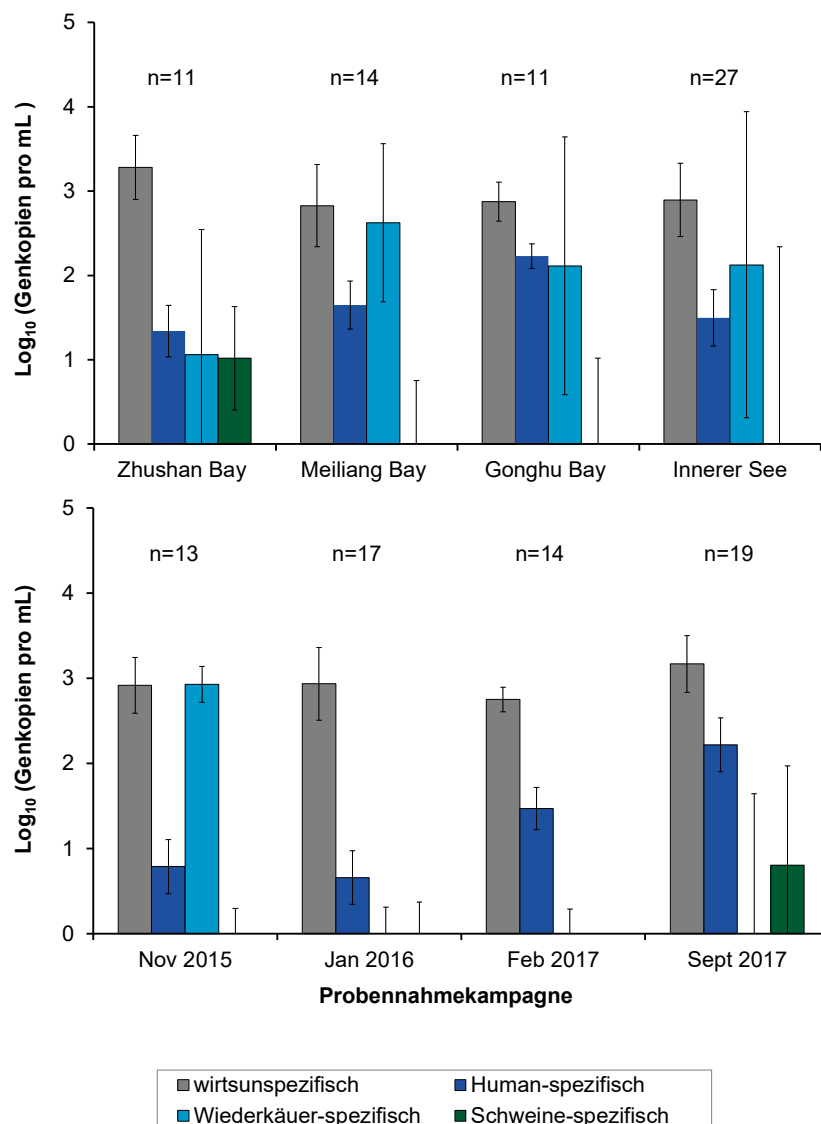


Abbildung 5.18: Räumliche (links) und zeitliche (rechts) Unterschiede im Nachweis von wirtsunspezifischen, human-, Schweine- und Wiederkäuer-spezifischen Microbial Source Tracking-Markern im Tai-See. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen.

Im Allgemeinen war die fäkale Gesamtbelastung (Menschen, Wiederkäuer und Schweine) gering. Im Februar 2015 gab es Hinweise auf eine Verschmutzung des Sees durch Wiederkäuerfäzes. Darüber hinaus wurden für alle Bereiche im See und alle Probennahmekampagnen eine geringe Belastung durch humane Abwässer festgestellt. Auch andere MST-Studien zeigten, dass die Konzentration an Fäkalbakterien im Taihu relativ niedrig und ihr Ursprung wahrscheinlich nicht menschlich (kein kommunales Abwasser) ist (Wilhelm et al., 2011). Der Eintrag von Antibiotikaresistenzgenen durch Rinder- und Schweine-Gülle scheint eine untergeordnete Rolle zu spielen. Eine Kontamination des Taihu durch andere Quellen, wie z. B. Aquakulturen oder Geflügelhaltung, kann nicht ausgeschlossen werden.

Insgesamt liefert diese Studie wichtige Einblicke in das Vorkommen und die Häufigkeit von Antibiotikaresistenzgenen im Tai-See und spiegelt die Bedeutung von Oberflächenwasser als Reservoir für die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen wider. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die zugrundeliegenden hydrogeochemischen und biologischen Faktoren des Transportes, des Transfers und der Elimination von Antibiotikaresistenzgenen in aquatischen Ökosystemen im Allgemeinen – und im Tai-See im Besonderen – besser zu verstehen.

Der Einsatz von *Bacteroides*-basierten MST-Systemen zur Identifizierung der Eintragsquellen von Antibiotikaresistenzgenen ist in dieser Form bislang kaum beschrieben. Einige wenige Studien haben den Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen und MST-Markern kombiniert (Chen et al., 2019; Vadde et al., 2019). Chen et al. (2019) untersuchten das Vorkommen von Antibiotikaresistenzgenen in Sedimenten eines peri-urbanen Flusses in Peking, China. Zusätzlich wurden das Auftreten von humanem Abwasser über den Nachweis von CrAssphagen (siehe 1.2.2.2 „Virale Marker“) erfasst. Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass humanes Abwasser eine potenzielle Quelle von Antibiotikaresistenzen im Sedimenten dieses Flusses ist. Stachler et al. (2019) untersuchten ebenfalls ein städtisch-geprägtes Oberflächengewässer auf das Vorkommen von Antibiotikaresistenzgenen und CrAssphagen. Die Ergebnisse zeigten erhöhte Konzentrationen der untersuchten Parameter bei Regenereignissen. Dies führte zu dem Schluss, dass die Antibiotikaresistenzgene in diesem Gewässer durch humanes Abwasser eingetragen werden. In ähnlicher Weise erfassten Vadde et al. (2019) MST-Marker und pathogene Mikroorganismen in Wasser- und Sedimentproben aus dem Fluss Tiaoxi, der zum Wassereinzugsgebiet des Tai-Sees gehört. Mehrere Stellen des Flusses waren stark durch Fäkalkontamination beeinflusst. Am häufigsten wurden humane Marker nachgewiesen, aber auch Sequenzen, die spezifisch für Fäkalien von Vögeln oder Schweine sind, wurden detektiert. Eine Studie von Li et al. (2015) fokussiert sich auf die Etablierung eines parallelen Nachweises von pathogenen Organismen (Viren, Bakterien und Protozoen), Antibiotikaresistenzgenen und MST-Markern mittels Microarrays. Anschließend wurde diese Technik für die Untersuchung von Umweltproben aus der ganzen Welt genutzt (Li et al., 2018). Insgesamt kamen die Autoren dieser Studie zum Schluss, dass die Kombination des Nachweises von MST-Markern und Antibiotikaresistenzgenen einen wichtigen Beitrag zur besser Bewertung der Antibiotikaresistenz-Belastung leisten kann. Die Information zu den Eintragsquellen der Antibiotikaresistenzgene ist einerseits für die Einstufung des Gefährdungspotenzials wichtig und andererseits können so wirksame Managementmaßnahmen und Kontrollstrategien zur Minimierung der Einträge erarbeitet und umgesetzt werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die Implementierung von effizienten und kostengünstigen Maßnahmen zur Verbesserung der mikrobiologischen Wasserqualität erfordert die Bestimmung der Herkunft fäkaler Verunreinigungen. Je mehr Informationen über das Einzugsgebiet sowie die fäkalen Kontaminationen vorliegen, umso gezielter können administrative oder technische Maßnahmen ergriffen werden. Die Erfassung von Indikatorbakterien ermöglicht den Nachweis von Beeinträchtigungen der Wasserqualität durch Fäkaleinträge, gibt jedoch keinen Aufschluss über die Herkunft der Kontamination. Neue Methoden haben das Potenzial, die Herkunft von Fäkaleinträgen möglichen Quellen zuzuordnen (Microbial Source Tracking, MST), werden aber in Deutschland bisher kaum genutzt.

Generell unterscheidet man diese Source Tracking-Verfahren in Datenbank-abhängige und Datenbank-unabhängige Methoden. Im Rahmen dieser Dissertation wurden verschiedene MST-Methoden weiterentwickelt und geprüft. Insgesamt lag der Fokus dieser Arbeit auf den Datenbank-unabhängigen Methoden (siehe Abbildung 1.2). Hierzu zählen Kultur-basierte Verfahren, wie der Nachweis von Toxingenen in *E. coli*-Isolaten, und Kultur-unabhängige Methoden wie die Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) oder der molekulargenetische Nachweis von DNA-Abschnitten, die spezifisch für menschliche oder tierische Fäkalien sind.

In einem ersten Schritt wurde der Kultur-basierte Nachweis von Toxingenen in *E. coli*-Isolaten geprüft. Die Untersuchungen trugen zu einem besseren Verständnis zum Vorkommen von pathogenen *E. coli* im Rhein bei. Vereinzelt konnten die Virulenzgene *eaeA*, *stx2*, *ipaH*, *aagR*, *bpf* und *astA* nachgewiesen werden (maximal in 4,3 % der Isolate), aber es wurden keine Diarrhö-verursachenden *E. coli*-Pathotypen detektiert. Insgesamt war die Prävalenz der Virulenzgene in den untersuchten *E. coli*-Isolaten gering. In Hinblick auf die Identifizierung von fäkalen Eintragsquellen erwies sich dieser Ansatz als nicht zielführend, da das seltene Vorkommen der Virulenzgene einen limitierenden Faktor darstellt. Das wirtsspezifische Virulenzgen ST konnte in keiner der 47 untersuchten *E. coli*-Isolate nachgewiesen werden.

Für die Untersuchung von komplexen Einzugsgebieten ist der Kultur-basierte Nachweis von Toxingenen nicht zielführend. Hier müssen empfindlichere MST-Methoden in Betracht gezogen werden.

Alternative Verfahren zur Identifizierung von fäkalen Einträgen in die aquatische Umwelt stellen Fingerprinting-Methoden dar. Zu diesen Methoden zählt auch die DGGE. Diese Methode wird

Die Anwendung der DGGE-Methodik ist durch die Verfügbarkeit von Vergleichsproben und die begrenzte Probenanzahl limitiert. Trotzdem belegen die Ergebnisse, dass die DGGE-Analyse zur Identifizierung von fäkalen Kontaminationen beitragen kann. Sie stellt ein ergänzendes Werkzeug zur quantitativen PCR-Analyse von wirtsspezifischen Sequenzen dar.

eingesetzt, um Änderungen in Bakteriengemeinschaften zu erfassen oder verschiedene Gemeinschaften miteinander zu vergleichen. Für die Analyse werden meist Primer genutzt, die sich gegen universelle Bereiche der bakteriellen 16S rDNA richten. Der Einsatz dieser Methode als Datenbank- und Kultur-unabhängiges Verfahren zum Zwecke der Identifizierung von fäkalen Kontaminationen ist kaum beschrieben. Die Anwendung von

universellen, bakteriellen 16S rDNA-basierten Primer führte für die Untersuchung von Feldproben zu einem diffusen Bandenmuster mit vielen Signalen. Eine Auswertung dieser Signale gestaltete sich schwierig. Im Vergleich hierzu erwiesen sich Primer, die spezifisch an ribosomale RNA-Gene von Bakterien der Gattung *Bacteroidales* binden, als wesentlich aussichtsreicher. Ein Vergleich der Bandenmuster zeigte eine hohe Ähnlichkeit der Muster aus kontaminierten Wasserproben eines Untersuchungsgebietes und dem Muster von humanem Abwasser.

Vielversprechende genetische Marker für eine quantitative MST-Anwendungen sind wirtsspezifische *Bacteroides* 16S rRNA-Genabschnitte oder Bereiche der eukaryotischen mitochondrialen DNA (mtDNA). Diese können über die real-time PCR quantitativ erfasst werden, und zählen damit ebenfalls zu den Datenbank- und Kultur-unabhängigen MST-Verfahren. Entsprechende Methoden für den Nachweis verschiedener fäkaler Einträge wurden im Rahmen dieser Arbeit geprüft und weiterentwickelt (siehe Tabelle 6.1). Diese Assays standen anschließend für Untersuchungen im Einzugsgebietsmaßstab zur Verfügung.

Tabelle 6.1: Microbial Source Tracking-Methoden, die im Rahmen dieser Arbeit etabliert wurden.

	<i>Bacteroides</i>-basierte Assays (Referenz für die Primersequenzen)	mtDNA-basierte Assays (Referenz für die Primersequenzen)
Wirtunspezifisch	AllBac296f/ 412r (Layton et al., 2006)	Umito2-G/-D2 (Kortbaoui et al., 2009)
Mensch	HF183/BacHum-241r (Seurinck et al., 2005)	Human Cyt b forward/reverse (Schill und Mathes, 2008)
Wiederkäuer / Rind	BacR_f/_r (Reischer et al., 2006)	Cow Cyt b forward/reverse (Schill und Mathes, 2008)
Schwein	Pig2 Bac 41F/163 R (Mieszkin et al., 2009)	-
Hund	DF475 F/Bac708R (Bernhard und Field, 2000a; Dick et al., 2005b)	Dog Cyt b forward/reverse (Schill und Mathes, 2008)
Pferd	-	Horse Cyt b forward/reverse (Schill und Mathes, 2008)
Huhn	-	Chicken Cyt b forward/reverse (Schill und Mathes, 2008)
Schaf	-	Sheep Cyt b forward/reverse (Schill und Mathes, 2008)

Untersuchungen von Kotproben unterschiedlicher Herkunft (Mensch, Rind, Schwein, Huhn, Wildtiere, etc.) zeigten, dass alle etablierten PCR-Assays eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweisen. Die Sensitivität gibt den Anteil an korrekt erfassten Positivbefunden an, während die Spezifität den Anteil der korrekt erfassten Negativbefunde darstellt. Für die *Bacteroides*-basierten Marker lag die Sensitivität bei 85,7-100 % und die Spezifität bei 73,3-93,3 %. In Hinblick auf die *Bacteroides*-basierten Marker ist keine Differenzierung zwischen verschiedenen wiederkäuenden Spezies, wie z. B. Rinder und Damwild, möglich. Für die mtDNA wurde eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von > 93,3 % ermittelt.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass es sich insbesondere bei den Bacteroides-basierten quantitativen PCR-Verfahren um sehr spezifische und empfindliche MST-Verfahren zur Identifizierung von fäkalen Einträgen handelt.

Die Bestimmungsgrenzen der PCR-Assays sind abhängig von der Menge an aufbereitetem Wasser, und liegen für ein Volumen von einem Liter bei 4 Kopien pro mL. Weitere Untersuchungen zur Nachweisempfindlichkeit ergaben, dass unter Verwendung des *Bacteroides*-basierten Markers 1 mL Abwasser bzw. 1 g frischer Hundekot in 10.000 L Wasser detektiert werden können. Mit mtDNA-basierten Markern ist ein Nachweis von 1 mL Abwasser bzw. 1 g in 100 L Probe möglich.

Orientierende Versuche zur Stabilität von Indikatorbakterien und MST-Markern in der aquatischen Umwelt zeigten eine Abhängigkeit von den eingestellten Randbedingungen. Insgesamt waren die Abbauraten aller genetischen Marker und Bakterien unter anaeroben Bedingungen niedriger als unter aeroben Bedingungen. Die Temperatur (10 °C oder 20 °C) hatte nur einen geringen Einfluss auf den Abbau. Die genetischen Marker waren im PCR-Verfahren deutlich länger nachweisbar als die Indikatorbakterien, die mittels Kulturverfahren erfasst wurden. Daher lässt das Verhältnis der Indikatorbakterien zu den MST-Markern Rückschlüsse auf das Alter einer Kontamination im Feld zu. Werden für die genetischen Marker erhöhte Genkopienzahlen ermittelt, wohingegen die Bakterienzahlen auf einem niedrigen Niveau bleiben, so spricht dies für eine Kontamination, die vor längerer Zeit eingetragen wurde.

Die etablierten Verfahren wurden für die Untersuchung von Modellgebieten genutzt. Anhand der ermittelten Daten konnten Aussagen über das Auftreten und die Stärke der fäkalen Belastungen gemacht werden. Außerdem konnten spezifische Kontaminationsquellen identifiziert werden (siehe nachfolgende Tabelle).

Tabelle 6.2: Stärke der fäkalen Belastung der unterschiedlichen Einzugsgebiete (+++ stark beeinflusst, ++ beeinflusst, + schwach beeinflusst, - nicht beeinflusst).

Einzugsgebiet	Allgemein	Mensch	Hund	Wiederkäuer	Schwein	Huhn
Gallusquelle	nach Regenereignissen +++	nach Regenereignissen +++	n.u.	n.u.	n.u.	im Frühjahr +
Kaulsdorf	++	+	+	-	-	n.u.
Tiefwerder	+++	++	+	-	-	n.u.
Kerspe	++	+	+	++	-	n.u.
Herbringhausen	+	-	+	-	-	n.u.

Bei der Untersuchung einer Karstquelle auf der Schwäbischen Alb konnten durch den Einsatz verschiedener MST-Methoden mehrfach humane Signale während Phasen mit erhöhter Trübung nachgewiesen werden. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse weisen alle darauf hin, dass im ländlichen Karsteinzugsgebiet der Quelle ein Regenrückhaltebecken die Haupteintragsquelle für fäkale Kontaminationen ist. Für die urbanen Einzugsgebiete Kaulsdorf und Tiefwerder belegen die Ergebnisse fäkale Einträge durch Mensch und Hund in die Oberflächengewässer. Auch in den Zuläufen der Talsperren Kerspe und Herbringhausen konnten Hundespezifische Marker nachgewiesen werden. Während die Wasserqualität der Talsperre Kerspe durch Menschen und Wiederkäuer negativ beeinflusst wird, konnte dies für die Talsperre Herbringhausen nicht ermittelt werden. Schweine wurden für kein Einzugsgebiet als Quelle fäkaler Kontaminationen identifiziert. Bei allen untersuchten Einzugsgebieten werden die Verunreinigungen durch mehrere Eintragsquelle verursacht.

Die Untersuchungen zum Auftreten von wirtsspezifischen MST-Markern in den Modellgebieten belegen die Praxistauglichkeit der PCR-basierten Methodik. Das Spektrum der im Projekt verwendeten Nachweissysteme lieferte wichtige Hinweise auf einen Großteil der Verursacher. In Hinblick auf die Ergebnisse wurden Empfehlungen zu gezielten Managementmaßnahmen in den verschiedenen Einzugsgebieten abgeleitet.

In den letzten Jahren haben Antibiotikaresistenzen als Untersuchungsparameter für die mikrobiologische Wasserqualität zunehmend an Bedeutung gewonnen. Ein wichtiger Schritt, um die Ausbreitung von Antibiotikaresistenzdeterminanten in der Umwelt besser verstehen, verhindern und bewerten zu können, ist die Identifikation ihrer Eintragswege. Aus diesem Grund wurden am Tai-See sowohl Untersuchungen

Insgesamt kann die Kombination des Nachweises von MST-Markern und Antibiotikaresistenzgenen einen wichtigen Beitrag zur besseren Bewertung der Antibiotikaresistenz-Belastung leisten. Durch die Ermittlung der Eintragswege kann einerseits das Gefährdungspotenzial, das von den Antibiotikaresistenzgenen ausgeht, besser eingeschätzt werden, und andererseits können wirksame Managementmaßnahmen und Kontrollstrategien zur Minimierung der Einträge von Antibiotikaresistenzgenen erarbeitet werden.

zum Vorkommen von Antibiotikaresistenzgenen als auch von MST-Markern durchgeführt. Diese Studie lieferte wichtige Informationen über das Vorkommen und die Häufigkeit von Antibiotikaresistenzgenen im Tai-See und spiegelt die Bedeutung von Oberflächenwasser als Reservoir für die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen wider. Für alle Bereiche im See wurde eine geringe Belastung durch menschliche Abwässer festgestellt. Dem Eintrag von Antibiotikaresistenzgenen durch Rinder- und Schweine-Gülle kann eine untergeordnete Rolle zugeordnet werden. Eine Kontamination des Tai-Sees durch andere Quellen, wie z. B. Aquakulturen oder Geflügelhaltung, konnten die Untersuchungen nicht ausschließen.

Der Schutz von Wassereinzugsgebieten ist eine wesentliche Voraussetzung für eine sichere und qualitativ hochwertige Trinkwasserversorgung. Je geringer die genutzten Gewässer belastet sind, desto sicherer ist der Betrieb der Anlagen zur Gewinnung und Aufbereitung. Auch bei Badegewässern stellen mikrobielle Kontaminationen ein Gesundheitsrisiko für den Menschen dar. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass mit den vorgestellten MST-Verfahren kostengünstige Werkzeuge für eine eindeutige Identifizierung von fäkalen Einträgen in komplexen Einzugsgebieten zur Verfügung stehen. Insbesondere die Unterscheidung zwischen humanen und nicht-humanen fäkalen Einträgen ist von Interesse, da humane Kontaminationen auch human-pathogene Mikroorganismen umfassen. Diese Differenzierung kann durch die Methodik geleistet werden. Auf Basis der Ergebnisse von MST-Untersuchungen können effizient Maßnahmen zur Verbesserung der mikrobiologischen Wasserqualität und zur Reduzierung gesundheitlicher Risiken abgeleitet werden. Insgesamt konnte die Praxistauglichkeit und das Potenzial dieser Verfahren in dieser Arbeit demonstriert werden. Für die Zukunft ist eine erhöhte Akzeptanz und damit auch Nutzung dieser Methodik für eine zielorientierende Bewirtschaftung von Gewässern wünschenswert.

7. EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN

Zeitschriften

Stange C., Tiehm A.

Occurrence of antibiotic resistance genes and microbial source tracking markers in the water of a karst spring in Germany

Science of the Total Environment 742: 140529, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.140529.

Ballesté E., Belanche-Muñoz L.A., Farnleitner A.H., Linke R., Sommer R., Santos R., Moneiro S., Maunula L., Oristo S., Tiehm A., Stange C., Blanch A.R.

Improving the identification of the source of faecal pollution in water using modelling approaches: from source to aged and diluted samples

Water Research 171: 115392, 2019, DOI: 10.1016/j.watres.2019.115392.

Stange C., Tiehm A.

Microbial Source Tracking - ein neuer Ansatz, um fäkale Eintragsquellen zu identifizieren.

energie|wasser-praxis (EWP) 5/19: 58-62, 2019.

Stange C., Yin D., Xu T., Guo X., Schäfer C., Tiehm A.

Distribution of clinically relevant antibiotic resistance genes in Lake Tai, China.

Science of the Total Environment 655: 337-346, 2019, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.11.211.

Stange C., Tiehm A.

Microbial Source Tracking – Molekularbiologische Identifizierung fäkaler Eintragsquellen.

In: Trinkwasserbiologie aktuell – Neue biologische Verfahren im Grund- und Trinkwassermanagement, Institut für Grundwasserökologie IGÖ GmbH (92 Seiten): 85-87, 2019, https://grundwasseroekologie.de/wp-content/uploads/2019/12/Grundwasserbiologie_Themenband_screen.pdf

Blanch A., Bouzid M., Burgess C., Chalmers R., Torres Costa C.M., Desmulliez M., van der Es M., Gunnarsdottir M.J., Höfle M., Hunter P., Lopez-Aviles A., Monteiro S., Martinez Murcia A., Ottoson J., Pedley S., Puigdomenech C., Rix B., Santos R., Schultz C., Stange C., Tiehm A.

Protecting the health of Europeans by improving methods for the detection of pathogens in drinking water and water used for food preparation – Key findings of the FP7

Aquavalens project.

Booklet, 2017.

Stange C., Sidhu J.P.S., Tiehm A., Toze S.

Antibiotic resistance and virulence genes in coliform water isolates.

International Journal of Hygiene and Environmental Health 219: 823-831, 2016, DOI: 10.1016/j.ijheh.2016.07.015.

Otto J., Jurzik L., Schneider M., Stange C., Hamza I., Preuß G., Tiehm A.

Entwicklung und Validierung von molekularbiologischen PCR-Methoden zum quantitativen Nachweis von hygienerelevanten Bakterien und Viren im Wasser.

energie|wasser-praxis (EWP), 2015, 10/15: 58-62, 2015.

Konferenzbeiträge*Stange C., Tiehm A.***Occurrence of antibiotic resistance genes and MST markers in a rural catchment.**

In: UNC Water Microbiology Conference 2017 and International Symposium on Health-Related Water Microbiology 2017, Chapel Hill, USA, 15-19 May, Proceedings: Page 99.

*Hügler M., Stange C., Ho J., Hambsch B., Tiehm A.:***Molekularbiologische Methoden – Trends und Entwicklungen.**

In: Entwicklungstrends für die Wasserversorgung, 22. TZW-Kolloquium, Veröffentlichungen aus dem Technologiezentrum Wasser, ISSN 1434-5765, Band 80: 45-63, 2017.

*Stange C., Tiehm A.***Auftreten von Antibiotika-Resistenzgenen, fäkalen Mikroorganismen und Microbial Source Tracking-Markern in einer Karstquelle.**

In: Blum P. et al. (Hrsg.), Grundwasser-Mensch-Ökosysteme, 25. Tagung der FH-DGGV, Karlsruhe, 13.-17. April 2016: 188-189, 2016.

*Blanch A.R., Ballesté E., Muniesa M., Stange C., Tiehm A., Schuster N., Farnleitner A.H., Sommer R., Lindner G., Nunes-Monteiro S.P., Santos R., Oristo S., Maunula L., Lucena F.***Selection of workable combinations of microbial source tracking markers to distinguish faecal pollution from more than two origins: an ongoing EU project.**

In: 18th International Symposium on Health Related Water Microbiology, IWA WaterMicro 2015, Lisbon, Portugal, 13-19 September 2015, Proceedings: 42-44, 2015.

*Monteiro S., Schuster N., Moreira B., Ballesté E., Stange C., Tiehm A., Reischer G., Oristo S., Blanch A.R., Farnleitner A.H., Santos R.***Quantitative occurrence of genetic microbial source tracking markers in target and non-target fecal sources across Europe.**

In: 18th International Symposium on Health Related Water Microbiology, IWA WaterMicro 2015, Lisbon, Portugal, 13-19 September 2015, Proceedings: 508-510, 2015.

*Stange C., Tiehm A.***Identification of fecal pollution sources at a karst spring.**

In: 18th International Symposium on Health Related Water Microbiology, IWA WaterMicro 2015, Lisbon, Portugal, 13-19 September 2015, Proceedings: 123-125, 2015.

*Stange C., Tiehm A.***Occurrence of antibiotic resistance genes and faecal indicator bacteria at a karst spring.**

In: 3rd International Symposium on the Environmental Dimension of Antibiotic Resistance (EDAR 3), Wernigerode/Germany, 17-21 May 2015, Book of Abstracts: 87-88, 2015.

*Stange C., Tiehm A.***Molekularbiologische Identifizierung fäkaler Eintragsquellen in einem Karst-Einzugsgebiet.**

Veröffentlichungen aus dem Technologiezentrum Wasser Karlsruhe, ISSN 1434-5765, Band 65: 35-50, 2014.

8. FINANZIELLE FÖRDERUNG

Die verschiedenen Teilaspekte dieser Dissertation wurden im Rahmen verschiedener Forschungsprojekte bearbeitet. Hiermit möchte ich dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), der Europäischen Kommission (EU) und dem Deutschen Verein des Gas- und Wasserfaches e. V. (DVGW) für die Förderung folgender Forschungsprojekte danken:

- **AGRO:** Risikomanagement von Spurenstoffen und Krankheitserregern in ländlichen Karsteinzugsgebieten, Teilprojekt 3, BMBF, Fördermaßnahme: RiSKWa, Förderkennzeichen: 02WRS1277C
- **MicSource:** Etablierung von Werkzeugen für die Identifizierung von fäkalen Eintragsquellen im Einzugsgebietsmaßstab, DVGW, Förderkennzeichen: W7/02/14
- **Water Quality in Managed Aquifer Recharge:** Wasserqualitätsaspekte bei der Grundwasseranreicherung, Teilprojekt TZW: Elimination von Mikroorganismen und Emerging Pollutants, BMBF, Fördermaßnahme APRA, Förderkennzeichen: 01DR12068
- **Aquavalens:** Protecting the health of Europeans by improving methods for the detection of pathogens in drinking water and water used in food preparation, EU, Förderkennzeichen: 311846
- **SIGN:** Sino-German water supply Network – Clean water from the source to the tap, Fördermaßnahme: CLIENT China, BMBF, Förderkennzeichen: 02 WCL 1336A

9. LITERATURVERZEICHNIS

- Ahammad, Z.S., Sreekrishnan, T.R., Hands, C.L., Knapp, C.W., Graham, D.W., 2014. Increased waterborne *bla*_{NDM-1} resistance gene abundances associated with seasonal human pilgrimages to the upper Ganges River. *Environ. Sci. Technol.* 48 (5), 3014–3020, <https://doi.org/10.1021/es405348h>.
- Ahmed, W., Goonetilleke, A., Gardner, T., 2010a. Human and bovine adenoviruses for the detection of source-specific fecal pollution in coastal waters in Australia. *Water Res.* 44 (16), 4662–4673, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.05.017>.
- Ahmed, W., Goonetilleke, A., Powell, D., Chauhan, K., Gardner, T., 2009a. Comparison of molecular markers to detect fresh sewage in environmental waters. *Water Res.* 43 (19), 4908–4917, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.09.047>.
- Ahmed, W., Goonetilleke, A., Powell, D., Gardner, T., 2009b. Evaluation of multiple sewage-associated *Bacteroides* PCR markers for sewage pollution tracking. *Water Res.* 43 (19), 4872–4877, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.08.042>.
- Ahmed, W., Goonetilleke, A., Gardner, T., 2008a. Alternative indicators for detection and quantification of faecal pollution. *Water* 35 (1), 39–45.
- Ahmed, W., Katouli, M., 2008. Phenotypic variations of enterococci in surface waters: Analysis of biochemical fingerprinting data from multi-catchments. *J. Appl. Microbiol.* 105 (2), 452–458, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03763.x>.
- Ahmed, W., Lobos, A., Senkbeil, J., Peraud, J., Gallard, J., Harwood, V.J., 2018. Evaluation of the novel crAssphage marker for sewage pollution tracking in storm drain outfalls in Tampa, Florida. *Water Res.* 131, 142–150, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.011>.
- Ahmed, W., Neller, R., Katouli, M., 2005. Host species-specific metabolic fingerprint database for enterococci and *Escherichia coli* and its application to identify sources of fecal contamination in surface waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (8), 4461–4468, <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4461-4468.2005>.
- Ahmed, W., Powell, D., Goonetilleke, A., Gardner, T., 2008b. Detection and source identification of faecal pollution in non-sewered catchment by means of host-specific molecular markers. *Water Sci. Technol.* 58 (3), 579–586, <https://doi.org/10.2166/wst.2008.436>.
- Ahmed, W., Sritharan, T., Palmer, A., Sidhu, J. P. S., Toze, S., 2013. Evaluation of bovine feces-associated microbial source tracking markers and their correlations with fecal indicators and zoonotic pathogens in a Brisbane, Australia, reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.* 79 (8), 2682–2691, <https://doi.org/10.1128/AEM.03234-12>.
- Ahmed, W., Stewart, J., Gardner, T., Powell, D., 2008c. A real-time polymerase chain reaction assay for quantitative detection of the human-specific enterococci surface protein marker in sewage and environmental waters. *Environ. Microbiol.* 10 (12), 3255–3264, <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01715.x>.
- Ahmed, W., Stewart, J., Powell, D., Gardner, T., 2008d. Evaluation of the host-specificity and prevalence of enterococci surface protein (esp) marker in sewage and its application for sourcing human fecal pollution. *J. Environ. Qual.* 37 (4), 1583–1588, <https://doi.org/10.2134/jeq2007.0474>.
- Ahmed, W., Tucker, J., Harper, J., Neller, R., Katouli, M., 2006. Comparison of the efficacy of an existing versus a locally developed metabolic fingerprint database to identify non-point sources of faecal contamination in a coastal lake. *Water Res.* 40 (12), 2339–2348, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.04.016>.
- Ahmed, W., Wan, C., Goonetilleke, A., Gardner, T., 2010b. Evaluating sewage-associated JCV and BKV polyomaviruses for sourcing human fecal pollution in a coastal river in southeast Queensland, Australia. *J. Environ. Qual.* 39 (5), 1743, <https://doi.org/10.2134/jeq2010.0062>.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J.e.a., 2002. *Molecular biology of the cell*. 4th Ed. Garland Science, New York.
- Alexander, J., Knopp, G., Dötsch, A., Wieland, A., Schwartz, T., 2016. Ozone treatment of conditioned wastewater selects antibiotic resistance genes, opportunistic bacteria, and induce strong population shifts. *Sci. Total Environ.* 559, 103–112, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.154>.
- Anastasi, E.M., Matthews, B., Stratton, H.M., Katouli, M., 2012. Pathogenic *Escherichia coli* found in sewage treatment plants and environmental waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (16), 5536–5541, <https://doi.org/10.1128/AEM.00657-12>.
- Arcilla, M.S., van Hattem, J.M., Matamoros, S., Melles, D.C., Penders, J., Jong, M.D. de, Schultsz, C., 2016. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *Lancet Infect. Dis.* 16 (2), 147–149, [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00541-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00541-1).

- Arnason, U., Xu, X., Gullberg, A., 1996. Comparison between the complete mitochondrial DNA sequences of Homo and the common chimpanzee based on nonchimeric sequences. J. Mol. Evol. 42 (2), 145–152, <https://doi.org/10.1007/BF02198840>.
- Arthur, R.R., Dagostin, S., Shah, K.V., 1989. Detection of BK virus and JC virus in urine and brain tissue by the polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 27 (6), 1174–1179, <https://doi.org/10.1128/jcm.27.6.1174-1179.1989>.
- Ashbolt, N.J., Amézquita, A., Backhaus, T., Borriello, P., Brandt, K.K., Collignon, P., Coors, A., Finley, R., Gaze, W.H., Heberer, T., Lawrence, J.R., Larsson, D. G. Joakim, McEwen, S.A., Ryan, J.J., Schönfeld, J., Silley, P., Snape, J.R., van den Eede, C., Topp, E., 2013. Human Health Risk Assessment (HHRA) for environmental development and transfer of antibiotic resistance. Environ. Health. Perspect. 121 (9), 993–1001, <https://doi.org/10.1289/ehp.1206316>.
- Auckenthaler, A., Huggenberger, P., 2003. Pathogene Mikroorganismen im Grund- und Trinkwasser: Transport, Nachweismethoden, Wassermanagement, 1.th ed. Birkhäuser, Basel.
- Bäckhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., Gordon, J.I., 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. Science 307 (5717), 1915–1920, <https://doi.org/10.1126/science.1104816>.
- Bae, S., Wuertz, S., 2009. Rapid decay of host-specific fecal *Bacteroidales* cells in seawater as measured by quantitative PCR with propidium monoazide. Water Res. 43 (19), 4850–4859, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.06.053>.
- Bahaka, D., Neut, C., Khattabi, A., Monget, D., Gavini, F., 1993. Phenotypic and genomic analyses of human strains belonging or related to *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, and *Bifidobacterium breve*. Int. J. Syst. Bacteriol. 43 (3), 565–573, <https://doi.org/10.1099/00207713-43-3-565>.
- Baker-Austin, C., Morris, J., Lowther, J.A., Rangdale, R., Lees, D.N., 2009. Rapid identification and differentiation of agricultural faecal contamination sources using multiplex PCR. Lett. Appl. Microbiol. 49 (4), 529–532, <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02679.x>.
- Baker-Austin, C., Rangdale, R., Lowther, J., Lees, D.N., 2010. Application of mitochondrial DNA analysis for microbial source tracking purposes in shellfish harvesting waters. Water Sci. Technol. 61 (1), 1–7, <https://doi.org/10.2166/wst.2010.767>.
- Ballesté, E., Blanch, A.R., 2010. Persistence of *Bacteroides* species populations in a river as measured by molecular and culture techniques. Appl. Environ. Microbiol. 76 (22), 7608–7616, <https://doi.org/10.1128/AEM.00883-10>.
- Ballesté, E., Blanch, A.R., 2011. Bifidobacterial diversity and the development of new microbial source tracking indicators. Appl. Environ. Microbiol. 77 (10), 3518–3525, <https://doi.org/10.1128/AEM.02198-10>.
- Ballesté, E., Bonjoch, X., Belanche, L.A., Blanch, A.R., 2010. Molecular indicators used in the development of predictive models for microbial source tracking. Appl. Environ. Microbiol. 76 (6), 1789–1795, <https://doi.org/10.1128/AEM.02350-09>.
- Barwick, R.S., Levy, D.A., Craun, G.F., Beach, M. J., Calderon, R. L., 2000. Surveillance for waterborne-disease outbreak - United States, 1997-1998. MMWR CDC Surveill. Summ. 49 (4), 1–35.
- Bassett, R.L., Buszka, P.M., Davidson, G.R., Chong-Diaz, D., 2002. Identification of groundwater solute sources using boron isotopic composition. Environ. Sci. Technol. 29 (12), 2915–2922, <https://doi.org/10.1021/es00012a005>.
- Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., Larsson, D. G. Joakim, 2018. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. FEMS Microbiol. Rev. 42 (1), <https://doi.org/10.1093/femsre/fux053>.
- Berendonk, T.U., Manaia, C.M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Bürgmann, H., Sørum, H., Norström, M., Pons, M.-N., Kreuzinger, N., Huovinen, P., Stefani, S., Schwartz, T., Kisand, V., Baquero, F., Martinez, J.L., 2015. Tackling antibiotic resistance: The environmental framework. Nat. Rev. Microbiol. 13 (5), 310–317, <https://doi.org/10.1038/nrmicro3439>.
- Bernhard, A.E., Field, K.G., 2000a. A PCR assay to discriminate human and ruminant feces on basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 66 (10), 4571–4574, <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4571-4574.2000>.
- Bernhard, A.E., Field, K.G., 2000b. Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes. Appl. Environ. Microbiol. 66 (4), 1587–1594, <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1587-1594.2000>.
- Beulke, S., Malkomes, H.-P., 2001. Effects of the herbicides metazachlor and dinoterb on the soil microflora and the degradation and sorption of metazachlor under different environmental conditions. Biol. Fertil. Soils 33 (6), 467–471, <https://doi.org/10.1007/s003740100354>.

- Bialasiewicz, S., Whiley, D.M., Lambert, S.B., Nissen, M.D., Sloots, T.P., 2009. Detection of BK, JC, WU, or KI polyomaviruses in faecal, urine, blood, cerebrospinal fluid and respiratory samples. *J. Clin. Virol.* 45 (3), 249–254, <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.05.002>.
- Bibbal, D., Dupouy, V., Ferré, J.P., Toutain, P.L., Fayet, O., Prère, M.F., Bousquet-Mélou, A., 2007. Impact of three ampicillin dosage regimens on selection of ampicillin resistance in *Enterobacteriaceae* and excretion of *bla*_{TEM} genes in swine feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (15), 4785–4790, <https://doi.org/10.1128/AEM.00252-07>.
- Birk, S., Geyer, T., Liedl, R., Sauter, M., 2005. Process-based interpretation of tracer tests in carbonate aquifers. *Groundwater* 43 (3), 381–388, <https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.2005.0033.x>.
- Birnbaum, D., Herwaldt, L., Low, D.E., Noble, M., Pfaller, M., Sherertz, R., Chow, A.W., 1994. Efficacy of microbial identification system for epidemiologic typing of coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 32 (9), 2113–2119, <https://doi.org/10.1128/jcm.32.9.2113-2119.1994>.
- Bitton, G., 2005. *Wastewater Microbiology*.
- Blanch, A.R., Belanche-Munoz, L., Bonjoch, X., Ebdon, J., Gantzer, C., Lucena, F., Ottoson, J., Kourtis, C., Iversen, A., Kuhn, I., Moce, L., Muniesa, M., Schwartzbrod, J., Skrabber, S., Papageorgiou, G., Taylor, H.D., Wallis, J., Jofre, J., 2004. Tracking the origin of faecal pollution in surface water: An ongoing project within the European Union research programme. *J. Water Health* 2 (4), 249–260.
- Blanch, A.R., Belanche-Munoz, L., Bonjoch, X., Ebdon, J., Gantzer, C., Lucena, F., Ottoson, J., Kourtis, C., Iversen, A., Kühn, I., Mocé, L., Muniesa, M., Schwartzbrod, J., Skrabber, S., Papageorgiou, G.T., Taylor, H., Wallis, J., Jofre, J., 2006. Integrated analysis of established and novel microbial and chemical methods for microbial source tracking. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (9), 5915–5926, <https://doi.org/10.1128/AEM.02453-05>.
- Bleas, M.J., Grandis, S.A. de, Lee, H., Trevors, J.T., 1998. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): Amplified fragment length polymorphism (AFLP): A review of the procedure and its applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 21 (3), 99–114, <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900537>.
- Boehm, A.B., van de Werfhorst, L.C., Griffith, J.F., Holden, P.A., Jay, J.A., Shanks, O.C., Wang, D., Weisberg, S.B., 2013. Performance of forty-one microbial source tracking methods: A twenty-seven lab evaluation study. *Water Res.* 47 (18), 6812–6828, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.12.046>.
- Boerlin, P., McEwen, S.A., Boerlin-Petzold, F., Wilson, J.B., Johnson, R.P., Gyles, C.L., 1999. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J. Clin. Microbiol.* 37 (3), 497–503, <https://doi.org/10.1128/JCM.37.3.497-503.1999>.
- Bofill-Mas, S., Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Rodriguez-Manzano, J., Allard, A., Calvo, M., Girones, R., 2006. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (12), 7894–7896, <https://doi.org/10.1128/AEM.00965-06>.
- Bofill-Mas, S., Pina, S., Girones, R., 2000. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (1), 238–245, <https://doi.org/10.1128/AEM.66.1.238-245.2000>.
- Bogenhagen, D., Clayton, D.A., 1974. The number of mitochondrial deoxyribonucleic acid genomes in mouse L and human HeLa cells. Quantitative isolation of mitochondrial deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 249 (24), 7991–7995, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42063-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42063-2).
- Bollback, J.P., Huelsenbeck, J.P., 2001. Phylogeny, genome evolution, and host specificity of single-stranded RNA bacteriophage (family *Leviviridae*). *J. Mol. Evol.* 52 (2), 117–128, <https://doi.org/10.1007/s002390010140>.
- Bonjoch, X., Balleste, E., Blanch, A.R., 2005. Enumeration of bifidobacterial populations with selective media to determine the source of waterborne fecal pollution. *Water Res.* 39 (8), 1621–1627, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.01.018>.
- Bonjoch, X., Ballesté, E., Blanch, A.R., 2004. Multiplex PCR with 16S rRNA gene-targeted primers of *Bifidobacterium* spp. to identify sources of fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (5), 3171–3175, <https://doi.org/10.1128/AEM.70.5.3171-3175.2004>.
- Bonjoch, X., Lucena, F., Blanch, A.R., 2009. The persistence of bifidobacteria populations in a river measured by molecular and culture techniques. *J. Appl. Microbiol.* 107 (4), 1178–1185, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04297.x>.
- Brion, G.M., Meschke, J.S., Sobsey, M.D., 2002. F-specific RNA coliphages: Occurrence, types, and survival in natural waters. *Water Res.* 36 (9), 2419–2425, [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00547-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00547-4).
- Brodie, E.L., Desantis, T.Z., Joyner, D.C., Baek, S.M., Larsen, J.T., Andersen, G.L., Hazen, T.C., Richardson, P.M., Herman, D.J., Tokunaga, T.K., Wan, J.M., Firestone, M.K., 2006. Application of a high-density oligonucleotide microarray approach to study bacterial population dynamics during uranium reduction and reoxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (9), 6288–6298, <https://doi.org/10.1128/AEM.00246-06>.

- Buchan, A., Alber, M., Hodson, R.E., 2001. Strain-specific differentiation of environmental *Escherichia coli* isolates via denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis of the 16Sâ23S intergenic spacer region. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35 (3), 313–321, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2001.tb00817.x>.
- Buerge, I.J., Buser, H.-R., Kahle, M., Müller, M.D., Poiger, T., 2009. Ubiquitous occurrence of the artificial sweetener acesulfame in the aquatic environment: An ideal chemical marker of domestic wastewater in groundwater. *Environ. Sci. Technol.* 43 (12), 4381–4385, <https://doi.org/10.1021/es900126x>.
- Buerge, I.J., Poiger, T., Müller, M.D., Buser, H.-R., 2003. Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters. *Environ. Sci. Technol.* 37 (4), 691–700, <https://doi.org/10.1021/es020125z>.
- Buerge, I.J., Poiger, T., Müller, M.D., Buser, H.-R., 2006. Combined sewer overflows to surface waters detected by the anthropogenic marker caffeine. *Environ. Sci. Technol.* 13 (40), 4096–4102.
- Burkhardt, M., Kupper, T., Hean, S., Haag, R., Schmid, P., Kohler, M., Boller, M., 2007. Biocides used in building materials and their leaching behavior to sewer systems. *Water Sci. Technol.* 56 (12), 63–67, <https://doi.org/10.2166/wst.2007.807>.
- Burkhardt, M., Zuleeg, S., Vonbank, R., Schmid, P., Hean, S., Lamani, X., Bester, K., Boller, M., 2011. Leaching of additives from construction materials to urban storm water runoff. *Water Sci. Technol.* 63 (9), 1974–1982, <https://doi.org/10.2166/wst.2011.128>.
- Burtscher, M.M., Köllner, K.E., Sommer, R., Keiblinger, K., Farnleitner, A.H., Mach, R.L., 2006. Development of a novel amplified fragment length polymorphism (AFLP) typing method for enterococci isolates from cattle faeces and evaluation of the single versus pooled faecal sampling approach. *J. Microbiol. Methods* 67 (2), 281–293, <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.04.016>.
- Bushnell, G., Mitrani-Gold, F., Mundy, L.M., 2013. Emergence of New Delhi metallo- β -lactamase type 1-producing *Enterobacteriaceae* and non-*Enterobacteriaceae*: Global case detection and bacterial surveillance. *Int. J. Infect. Dis.* 17 (5), e325–33, <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2012.11.025>.
- Byappanahalli, M.N., Nevers, M.B., Korajkic, A., Staley, Z.R., Harwood, V.J., 2012. Enterococci in the environment. *Microbiol Mol Biol Rev* 4 (76), 685–706.
- Byappanahalli, M.N., Przybyla-Kelly, K., Shively, D.A., Whitman, R.L., 2008. Environmental occurrence of the enterococcal surface protein (esp) gene is an unreliable indicator of human fecal contamination. *Environ. Sci. Technol.* 42 (21), 8014–8020, <https://doi.org/10.1021/es800481p>.
- Cabral, J.P.S., 2010. Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *Int J Environ Res Public Health* 7 (10), 3657–3703, <https://doi.org/10.3390/ijerph7103657>.
- Caldwell, J.M., Payment, P., Villemur, R., 2011. Mitochondrial DNA as source tracking markers of fecal contamination. Springer, New York. *Microbial Source Tracking: Methods, Applications and Case Studies*, 229–250.
- Caldwell, J.M., Raley, M.E., Levine, J.F., 2007. Mitochondrial multiplex real-time PCR as a source tracking method in fecal-contaminated effluents. *Environ. Sci. Technol.* 41 (9), 3277–3283, <https://doi.org/10.1021/es062912s>.
- Caltagirone, M., Nucleo, E., Spalla, M., Zara, F., Novazzi, F., Marchetti, V.M., Piazza, A., Bitar, I., Cicco, M. de, Paolucci, S., Pilla, G., Migliavacca, R., Pagani, L., 2017. Occurrence of extended spectrum β -lactamases, KPC-type, and MCR-1.2-producing *Enterobacteriaceae* from wells, river water, and wastewater treatment plants in Oltrepò Pavese area, Northern Italy. *Front. Microbiol.* 8, 2232, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02232>.
- Carratalà, A., Rusinol, M., Hundesa, A., Biarnes, M., Rodríguez-Manzano, J., Vantarakis, A., Kern, A., Suñen, E., Girones, R., Bofill-Mas, S., 2012. A novel tool for specific detection and quantification of chicken/turkey parvoviruses to trace poultry fecal contamination in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (20), 7496–7499, <https://doi.org/10.1128/AEM.01283-12>.
- Carson, C.A., Shear, B.L., Ellersieck, M.R., Asfaw, A., 2001. Identification of fecal *Escherichia coli* from humans and animals by ribotyping. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (4), 1503–1507, <https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1503-1507.2001>.
- Carson, C.A., Shear, B.L., Ellersieck, M.R., Schnell, J.D., 2003. Comparison of ribotyping and repetitive extragenic palindromic-PCR for identification of fecal *Escherichia coli* from humans and animals. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (3), 1836–1839, <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1836-1839.2003>.
- Cartelle, M., del Mar Tomas, M., Molina, F., Moure, R., Villanueva, R., Bou, G., 2004. High-level resistance to ceftazidime conferred by a novel enzyme, CTX-M-32, derived from CTX-M-1 through a single Asp240-Gly substitution. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (6), 2308–2313, <https://doi.org/10.1128/AAC.48.6.2308-2313.2004>.

- Chandran, A., Mazumder, A., 2015. Investigation on the temporal variation and source tracking of faecal bacteria in a forest dominated watershed (Comox Lake), British Columbia, Canada. *J. Appl. Microbiol.* 119 (6), 1718–1728, <https://doi.org/10.1111/jam.12969>.
- Chen, B., Zheng, W., Yu, Y., Huang, W., Zheng, S., Zhang, Y., Guan, X., Zhuang, Y., Chen, N., Topp, E., 2011. Class 1 integrons, selected virulence genes, and antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates from the Minjiang River, Fujian Province, China. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (1), 148–155, <https://doi.org/10.1128/AEM.01676-10>.
- Chen, H., Bai, X., Li, Y., Jing, L., Chen, R., Teng, Y., 2019. Characterization and source-tracking of antibiotic resistomes in the sediments of a peri-urban river. *Sci. Total Environ.* 679, 88–96, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.063>.
- Chern, E.C., Tsai, Y.-L., Olson, B.H., 2004. Occurrence of genes associated with enterotoxigenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in agricultural waste lagoons. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (1), 356–362, <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.356-362.2004>.
- China Business Guide (CBG), 2014. Antibiotic market analysis report in 2013–2018 in China (accessed 2.08.2019).
- Christ, A.P.G., Ramos, S.R., Cayô, R., Gales, A.C., Hachich, E.M., Sato, M.I.Z., 2017. Characterization of *Enterococcus* species isolated from marine recreational waters by MALDI-TOF MS and Rapid ID API® 20 Strep system. *Mar. Pollut. Bull.* 118 (1–2), 376–381, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.03.025>.
- Cimenti, M., Biswas, N., Bewtra, J.K., Hubberstey, A., 2005. Evaluation of microbial indicators for the determination of bacterial groundwater contamination sources. *Water Air Soil Pollut.* 168 (1), 157–169, <https://doi.org/10.1007/s11270-005-0961-y>.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (10), 4555–4558, <https://doi.org/10.1128/aem.66.10.4555-4558.2000>.
- Coakley, T., Brion, G.M., Fryar, A., 2009. Relationships between indicators of faecal load, source, and age: Developing a multi-indicator approach for risk characterization. 15th International Symposium of Health Related Microbiology, Naxos, Greece.
- Colford, J.M., Wade, T.J., Schiff, K.C., Wright, C.C., Griffith, J.F., Sandhu, S.K., Burns, S., Sobsey, M., Lovelace, G., Weisberg, S.B., 2007. Water quality indicators and the risk of illness at beaches with nonpoint sources of fecal contamination. *Epidemiol* 18 (1), 27–35, <https://doi.org/10.1097/01.ede.0000249425.32990.b9>.
- Contreras-Coll, N., Lucena, F., Mooijman, K., Havelaar, A., Pierz, V., Boque, M., Gawler, A., Holler, C., Lambiri, M., Mirolo, G., Moreno, B., Niemi, M., Sommer, R., Valentin, B., Wiedenmann, A., Young, V., Jofre, J., 2002. Occurrence and levels of indicator bacteriophages in bathing waters throughout Europe. *Water Res.* 36 (20), 4963–4974, [https://doi.org/10.1016/s0043-1354\(02\)00229-4](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(02)00229-4).
- Czekalski, N., Sigdel, R., Birtel, J., Matthews, B., Bürgmann, H., 2015. Does human activity impact the natural antibiotic resistance background? Abundance of antibiotic resistance genes in 21 Swiss lakes. *Environ. Int.* 81, 45–55, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.04.005>.
- Desantis, T.Z., Brodie, E.L., Moberg, J.P., Zubieta, I.X., Piceno, Y.M., Andersen, G.L., 2007. High-density universal 16S rRNA microarray analysis reveals broader diversity than typical clone library when sampling the environment. *Microb. Ecol.* 53 (3), 371–383, <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9134-9>.
- DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., Andersen, G.L., 2006. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (7), 5069–5072, <https://doi.org/10.1128/AEM.03006-05>.
- Devane, M.L., Robson, B., Nourozi, F., Scholes, P., Gilpin, B.J., 2007. A PCR marker for detection in surface waters of faecal pollution derived from ducks. *Water Res.* 41 (16), 3553–3560, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.043>.
- Devarajan, N., Laffite, A., Graham, N.D., Meijer, M., Prabakar, K., Mubedi, J.I., Elongo, V., Mpiana, P.T., Ibelings, B.W., Wildi, W., Poté, J., 2015. Accumulation of clinically relevant antibiotic-resistance genes, bacterial load, and metals in freshwater lake sediments in Central Europe. *Environ. Sci. Technol.* 49 (11), 6528–6537, <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01031>.
- Dick, L.K., Bernhard, A.E., Brodeur, T.J., Santo Domingo, Jorge W, Simpson, J.M., Walters, S.P., Field, K.G., 2005a. Host distributions of uncultivated fecal *Bacteroidales* bacteria reveal genetic markers for fecal source identification. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (6), 3184–3191, <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3184-3191.2005>.
- Dick, L.K., Field, K.G., 2004. Rapid estimation of numbers of fecal *Bacteroidetes* by use of a quantitative PCR assay for 16S rRNA genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70 (9), 5695–5697, <https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5695-5697.2004>.

- Dick, L.K., Simonich, M.T., Field, K.G., 2005b. Microplate subtractive hybridization to enrich for *Bacteroidales* genetic markers for fecal source identification. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (6), 3179–3183, <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3179-3183.2005>.
- Dick, L.K., Stelzer, E.A., Bertke, E.E., Fong, D.L., Stoeckel, D.M., 2010. Relative decay of *Bacteroidales* microbial source tracking markers and cultivated *Escherichia coli* in freshwater microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (10), 3255–3262, <https://doi.org/10.1128/AEM.02636-09>.
- DIN EN ISO 14189:2016-11. Wasserbeschaffenheit - Zählung von *Clostridium perfringens* - Verfahren mittels Membranfiltration (ISO 14189:2013); Deutsche Fassung EN ISO 14189:2016.
- DIN EN ISO 7899-2:2000-11. Wasserbeschaffenheit - Nachweis und Zählung von intestinalen Enterokokken - Teil 2: Verfahren durch Membranfiltration (ISO 7899-2:2000); Deutsche Fassung EN ISO 7899-2:2000.
- DIN ISO 16649-1:2009-12. Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Horizontales Verfahren für die Zählung von β -Glucuronidase-positiven *Escherichia coli* - Teil 1: Koloniezählverfahren bei 44 °C mit Membranen und 5-Brom-4-Chlor-3-Indol- β -D-Glucuronid.
- Diston, D., Wicki, M., 2015. Occurrence of bacteriophages infecting *Bacteroides* host strains (ARABA 84 and GB-124) in fecal samples of human and animal origin. *J. Water Health* 13 (3), 654–661, <https://doi.org/10.2166/wh.2014.199>.
- Dohmann, M., Chen, C., Grambow, M., Kolditz, O., Krebs, P., Schmidt, K.R., Subklew, G., Tiehm, A., Wermter, P., Dai, X.H., Liao, Z.L., Meng, W., Song, Y.H., Yin, D., Zheng, B.H., 2016. German contributions to the Major Water Program in China: Innovation Cluster–Major Water. *Environ. Earth Sci.* 75 (8), 703, <https://doi.org/10.1007/s12665-016-5504-x>.
- Dörries, K., 1998. Molecular biology and pathogenesis of human polyomavirus infections. *Dev. Biol. Stand.* 94, 71–79.
- Dunfield, K.E., Germida, J.J., 2003. Seasonal changes in the rhizosphere microbial communities associated with field-grown genetically modified canola (*Brassica napus*). *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (12), 7310–7318, <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7310-7318.2003>.
- Dutilh, B.E., Cassman, N., McNair, K., Sanchez, S.E., Silva, G.G.Z., Boling, L., Barr, J.J., Speth, D.R., Seguritan, V., Aziz, R.K., Felts, B., Dinsdale, E.A., Mokili, J.L., Edwards, R.A., 2014. A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes. *Nat. Commun.* 5, 4498, <https://doi.org/10.1038/ncomms5498>.
- Ebdon, J., Muniesa, M., Taylor, H., 2007. The application of a recently isolated strain of *Bacteroides* (GB-124) to identify human sources of faecal pollution in a temperate river catchment. *Water Res.* 41 (16), 3683–3690, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.12.020>.
- Ebdon, J.E., Taylor, H.D., 2006. Geographical stability of enterococcal antibiotic resistance profiles in Europe and its implications for the identification of fecal sources. *Environ. Sci. Technol.* 40 (17), 5327–5332, <https://doi.org/10.1021/es0607180>.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., Relman, D.A., 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308 (5728), 1635–1638, <https://doi.org/10.1126/science.1110591>.
- Edberg, S.C., Rice, E.W., Karlin, R.J., Allen, M.J., 2000. *Escherichia coli*: The best biological drinking water indicator for public health protection. *J. Appl. Microbiol.* 88, 106S–116S, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2000.tb05338.x>.
- Emery, C.L., Weymouth, L.A., 1997. Detection and clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases in a tertiary-care medical center. *J. Clin. Microbiol.* 35 (8), 2061–2067, <https://doi.org/10.1128/jcm.35.8.2061-2067.1997>.
- Ervin, J.S., Van De Werfhorst, Laurie C, Murray, Jill L S, Holden, P.A., 2014. Microbial source tracking in a coastal California watershed reveals canines as controllable sources of fecal contamination. *Environ. Sci. Technol.* 48 (16), 9043–9052, <https://doi.org/10.1021/es502173s>.
- Escobar-Paramo, P., Clermont, O., Blanc-Potard, A.-B., Bui, H., Le Bouguenec, C., Denamur, E., 2004a. A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Evol.* 21 (6), 1085–1094, <https://doi.org/10.1093/molbev/msh118>.
- Escobar-Paramo, P., Grenet, K., Le Menac'h, A., Rode, L., Salgado, E., Amorin, C., Gouriou, S., Picard, B., Rahimy, M.C., Andremont, A., Denamur, E., Ruimy, R., 2004b. Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (9), 5698–5700, <https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5698-5700.2004>.

- Esseili, M.A., Kassem, I.I., Sigler, V., 2008. Optimization of DGGE community fingerprinting for characterizing *Escherichia coli* communities associated with fecal pollution. *Water Res.* 42 (17), 4467–4476, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.08.002>.
- Farber, J.M., 1996. An introduction to the hows and whys of molecular typing. *J. Food Protect.* 59 (10), 1091–1101, <https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.10.1091>.
- Farnleitner, A.H., Kreuzinger, N., Kavka, G.G., Grillenberger, S., Rath, J., Mach, R.L., 2000. Simultaneous detection and differentiation of *Escherichia coli* populations from environmental freshwaters by means of sequence variations in a fragment of the beta-D-glucuronidase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (4), 1340–1346, <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1340-1346.2000>.
- Farnleitner, A.H., Ryzinska-Paier, G., Reischer, G.H., Burtscher, M.M., Knetsch, S., Kirschner, A.K.T., Dirnböck, T., Kuschnig, G., Mach, R.L., Sommer, R., 2010. *Escherichia coli* and enterococci are sensitive and reliable indicators for human, livestock and wildlife faecal pollution in alpine mountainous water resources. *J. Appl. Microbiol.* 109 (5), 1599–1608, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04788.x>.
- Farnleitner, A.H., Wilhartitz, I., Ryzinska, G., Kirschner, A.K.T., Stadler, H., Burtscher, M.M., Hornek, R., Szewzyk, U., Herndl, G., Mach, R.L., 2005. Bacterial dynamics in spring water of alpine karst aquifers indicates the presence of stable autochthonous microbial endokarst communities. *Environ. Microbiol.* 7 (8), 1248–1259, <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00810.x>.
- Field, K.G., Bernhard, A.E., 2004. Detection of fecal contamination.
- Field, K.G., Bernhard, A.E., Brodeur, T.J., 2003. Molecular approaches to microbiological monitoring: Fecal source detection. *Environ. Monit. Assess.* 81 (1-3), 312–326, <https://doi.org/10.1023/A:1021349629950>.
- Field, K.G., Samadpour, M., 2007. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water Res.* 41 (16), 3517–3538, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.056>.
- Fogarty, L.R., Voytek, M.A., 2005. Comparison of *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers for fecal samples from different animal species. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (10), 5999–6007, <https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.5999-6007.2005>.
- Fong, T.-T., Griffin, D.W., Lipp, E.K., 2005. Molecular assays for targeting human and bovine enteric viruses in coastal waters and their application for library-independent source tracking. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (4), 2070–2078, <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.2070-2078.2005>.
- Fongaro, G., Nascimento, M.A., Viancelli, A., Tonetta, D., Petrucio, M.M., Barardi, C.R.M., 2012. Surveillance of human viral contamination and physicochemical profiles in a surface water lagoon. *Water Sci. Technol.* 66 (12), 2682–2687, <https://doi.org/10.2166/wst.2012.504>.
- Frahm, E., Obst, U., 2003. Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples. *J. Microbiol. Methods* 52 (1), 123–131, [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(02\)00150-1](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(02)00150-1).
- Francy, D.S., Stelzer, E.A., 2012. Microbial source tracking markers at three inland recreational lakes in Ohio, 2011 (2012-1222), <https://doi.org/10.3133/ofr20121222>.
- Fremaux, B., Boa, T., Yost, C.K., 2010. Quantitative real-time PCR assays for sensitive detection of Canada goose-specific fecal pollution in water sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (14), 4886–4889, <https://doi.org/10.1128/AEM.00110-10>.
- Funke, J., Prasse, C., Lütke Eversloh, C., Ternes, T.A., 2015. Oxypurinol – A novel marker for wastewater contamination of the aquatic environment. *Water Res.* 74, 257–265, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.02.007>.
- Furuse, K., 1987. Distribution of coliphages in the environment: General considerations. *Phage Ecol.*
- Furuse, K., Ando, A., Osawa, S., Watanabe, I., 1979. Continuous survey of the distribution of RNA coliphages in Japan. *Microbiol. Immunol.* 23 (9), 867–875, <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1979.tb02820.x>.
- Furuse, K., Sakurai, T., Hirashima, A., Katsuki, M., Ando, A., Watanabe, I., 1978. Distribution of ribonucleic acid coliphages in South and East Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* 35 (6), 995–1002, <https://doi.org/10.1128/aem.35.6.995-1002.1978>.
- Gawler, A.H., Beecher, J.E., Brandao, J., Carroll, N.M., Falcao, L., Gourmelon, M., Masterson, B., Nunes, B., Porter, J., Rince, A., Rodrigues, R., Thorp, M., Walters, J.M., Meijer, W.G., 2007. Validation of host-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genes as markers to determine the origin of faecal pollution in Atlantic Rim countries of the European Union. *Water Res.* 41 (16), 3780–3784, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.01.028>.
- Geldreich, E.E., Best, L.C., Kenner, B.A., van Donsel, D.J., 1968. The bacteriological aspects of stormwater pollution. *J. Water Pollut. Control Fed.* 40 (11), 1861–1872.
- Geldreich, E.E., Kenner, B.A., 1969. Concepts of fecal streptococci in stream pollution. *J. Water Pollut. Control Fed.* 41 (8), Suppl:R336+.

- Geldreich, E.E., Litsky, W., 1976. Fecal coliform and fecal streptococcus density relationships in waste discharges and receiving waters. *CRC Crit. Rev. Environ. Control* 6 (4), 349–369, <https://doi.org/10.1080/10643387609381645>.
- Genthner, F.J., James, J.B., Yates, D.F., Friedman, S.D., 2005. Use of composite data sets for source-tracking enterococci in the water column and shoreline interstitial waters on Pensacola Beach, Florida. *Mar. Pollut. Bull.* 50 (7), 724–732, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.02.026>.
- GERMAP, 2015. Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch: Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland.
- Geyer, T., Birk, S., Liedl, R., Sauter, M., 2008. Quantification of temporal distribution of recharge in karst systems from spring hydrographs. *J Hydrol* 348 (3-4), 452–463, <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2007.10.015>.
- Glipin, B.J., Gregor, J.E., Savill, M.G., 2002. Identification of the source of faecal pollution in contaminated rivers. *Water Sci. Technol.* 46 (3), 9–15, <https://doi.org/10.2166/wst.2002.0043>.
- Gómez-Doñate, M., Ballesté, E., Muniesa, M., Blanch, A.R., 2012. New molecular quantitative PCR assay for detection of host-specific *Bifidobacteriaceae* suitable for microbial source tracking. *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (16), 5788–5795, <https://doi.org/10.1128/AEM.00895-12>.
- Gordon, D.M., Bauer, S., Johnson, J.R., 2002. The genetic structure of *Escherichia coli* populations in primary and secondary habitats. *Microbiol.* 148 (Pt 5), 1513–1522, <https://doi.org/10.1099/00221287-148-5-1513>.
- Gordon, K.V., Brownell, M., Wang, S.Y., Lepo, J.E., Mott, J., Nathaniel, R., Kilgen, M., Hellein, K.N., Kennedy, E., Harwood, V.J., 2013. Relationship of human-associated microbial source tracking markers with enterococci in Gulf of Mexico waters. *Water Res.* 47 (3), 996–1004, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.10.032>.
- Graves, A.K., Hagedorn, C., Brooks, A., Hagedorn, R.L., Martin, E., 2007. Microbial source tracking in a rural watershed dominated by cattle. *Water Res.* 41 (16), 3729–3739, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.04.020>.
- Green, H.C., Dick, L.K., Gilpin, B., Samadpour, M., Field, K.G., 2012. Genetic markers for rapid PCR-based identification of gull, Canada goose, duck, and chicken fecal contamination in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (2), 503–510, <https://doi.org/10.1128/AEM.05734-11>.
- Green, H.C., Haugland, R.A., Varma, M., Millen, H.T., Borchardt, M.A., Field, K.G., Walters, W.A., Knight, R., Sivaganesan, M., Kelty, C.A., Shanks, O.C., 2014. Improved HF183 quantitative real-time PCR assay for characterization of human fecal pollution in ambient surface water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 80 (10), 3086–3094, <https://doi.org/10.1128/AEM.04137-13>.
- Griffin, D.W., Donaldson, K.A., Paul, J.H., Rose, J.B., 2003. Pathogenic human viruses in coastal waters. *Clin. Microbiol. Rev.* 16 (1), 129–143, <https://doi.org/10.1128/CMR.16.1.129-143.2003>.
- Griffin, D.W., Gibson, C.J., Lipp, E.K., Riley, K., Paul, J.H., Rose, J.B., 1999. Detection of viral pathogens by reverse transcriptase PCR and of microbial indicators by standard methods in the canals of the Florida Keys. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (9), 4118–4125, <https://doi.org/10.1128/AEM.65.9.4118-4125.1999>.
- Griffith, J.F., Layton, A.C., Boehm, A.B., Holden, P.A., Jay, J.A., Hagedorn, C., McGee, C.D., Weisberg, S.B., 2013. The California microbial source identification manual: A tiered approach to identifying fecal pollution sources to beaches. Technical Report.
- Guan, S., Xu, R., Chen, S., Odumeru, J., Gyles, C., 2002. Development of a procedure for discriminating among *Escherichia coli* isolates from animal and human sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (6), 2690–2698, <https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.2690-2698.2002>.
- Guérineau, H., Dorner, S., Carrière, A., McQuaid, N., Sauvé, S., Aboulfadl, K., Hajj-Mohamad, M., Prévost, M., 2014. Source tracking of leaky sewers: A novel approach combining fecal indicators in water and sediments. *Water Res.* 58, 50–61, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.03.057>.
- Guion, C.E., Ochoa, T.J., Walker, C.M., Barletta, F., Cleary, T.G., 2008. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by use of melting-curve analysis and real-time multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 46 (5), 1752–1757, <https://doi.org/10.1128/JCM.02341-07>.
- Gyllenberg, H., Niemelä, S., Sormunen, T., 1960. Survival of *Bifidobacteria* in water as compared with that of coliform bacteria and enterococci. *Appl. Microbiol.* 8 (1), 20–22, <https://doi.org/10.1128/am.8.1.20-22.1960>.
- Hagedorn, C., Blanch, A.R., Harwood, V.J., 2011. Microbial source tracking: Methods, applications, and case studies. Springer, New York.
- Hagedorn, C., Crozier, J.B., Mentz, K.A., Booth, A.M., Graves, A.K., Nelson, N.J., Reneau, R.B., JR, 2003. Carbon source utilization profiles as a method to identify sources of faecal pollution in water. *J. Appl. Microbiol.* 94 (5), 792–799, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01804.x>.

- Hagedorn, C., Robinson, S.L., Filtz, J.R., Grubbs, S.M., Angier, T.A., Reneau, R.B., JR, 1999. Determining sources of fecal pollution in a rural Virginia watershed with antibiotic resistance patterns in fecal streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (12), 5522–5531, <https://doi.org/10.1128/AEM.65.12.5522-5531.1999>.
- Hamilton, M.J., Hadi, A.Z., Griffith, J.F., Ishii, S., Sadowsky, M.J., 2010. Large scale analysis of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from Avalon Bay, CA. *Water Res.* 44 (18), 5463–5473, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.058>.
- Hansen, D.L., Ishii, S., Sadowsky, M.J., Hicks, R.E., 2009. *Escherichia coli* populations in Great Lakes waterfowl exhibit spatial stability and temporal shifting. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (6), 1546–1551, <https://doi.org/10.1128/AEM.00444-08>.
- Haramoto, E., Yamada, K., Nishida, K., 2011. Prevalence of protozoa, viruses, coliphages and indicator bacteria in groundwater and river water in the Kathmandu Valley, Nepal. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 105 (12), 711–716, <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.08.004>.
- Hartel, P.G., Summer, J.D., Segars, W.I., 2003. Deer diet affects ribotype diversity of *Escherichia coli* for bacterial source tracking. *Water Res.* 37 (13), 3263–3268, [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00170-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00170-2).
- Harwood, V., Shanks, O., Korajkic, A., Verbyla, M., Ahmed, W., Iriarte, M., 2018. General and host-associated bacterial indicators of faecal pollution, in: Rose, J., Jiménez-Cisneros, B. (Eds.), *Global water pathogen project*. Michigan State University.
- Harwood, V.J., Boehm, A.B., Sassoubre, L.M., Vijayavel, K., Stewart, J.R., Fong, T.-T., Caprais, M.-P., Converse, R.R., Diston, D., Ebdon, J., Fuhrman, J.A., Gourmelon, M., Gentry-Shields, J., Griffith, J.F., Kashian, D.R., Noble, R.T., Taylor, H., Wicki, M., 2013. Performance of viruses and bacteriophages for fecal source determination in a multi-laboratory, comparative study. *Water Res.* 47 (18), 6929–6943, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.04.064>.
- Harwood, V.J., Brownell, M., Wang, S., Lepo, J., Ellender, R.D., Ajidahun, A., Hellein, K.N., Kennedy, E., Ye, X., Flood, C., 2009. Validation and field testing of library-independent microbial source tracking methods in the Gulf of Mexico. *Water Res.* 43 (19), 4812–4819, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.06.029>.
- Harwood, V.J., Delahoya, N.C., Ulrich, R.M., Kramer, M.F., Whitlock, J.E., Garey, J.R., Lim, D.V., 2004. Molecular confirmation of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* from clinical, faecal and environmental sources. *Lett. Appl. Microbiol.* 38 (6), 476–482, <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01518.x>.
- Harwood, V.J., Levine, A.D., Scott, T.M., Chivukula, V., Lukasik, J., Farrah, S.R., Rose, J.B., 2005. Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (6), 3163–3170, <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3163-3170.2005>.
- Harwood, V.J., Staley, C., Badgley, B.D., Borges, K., Korajkic, A., 2014. Microbial source tracking markers for detection of fecal contamination in environmental waters: Relationships between pathogens and human health outcomes. *FEMS Microbiol. Lett.* 38 (1), 1–40, <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12031>.
- Harwood, V.J., Whitlock, J., Withingthorn, V., 2000. Classification of antibiotic resistance patterns of indicator bacteria discriminant analysis: Use in predicting the source of fecal contamination in subtropical waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (9), 3698–3704, <https://doi.org/10.1128/aem.66.9.3698-3704.2000>.
- Harwood, V.J., Wiggins, B., Hagedorn, C., Ellender, R.D., Gooch, J., Kern, J., Samadpour, M., Chapman, A.C.H., Robinson, B.J., Thompson, B.C., 2003. Phenotypic library-based microbial source tracking methods: Efficacy in the California collaborative study. *J. Water Health* 1 (4), 153–166.
- Haugland, R.A., Siefing, S.C., Wymer, L.J., Brenner, K.P., Dufour, A.P., 2005. Comparison of *Enterococcus* measurements in freshwater at two recreational beaches by quantitative polymerase chain reaction and membrane filter culture analysis. *Water Res.* 39 (4), 559–568, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.11.011>.
- Havelaar, A.H., Pot-Hogbeem, W.M., Furuse, K., Pot, R., Hormann, M.P., 1990. F-specific RNA bacteriophages and sensitive host strains in faeces and wastewater of human and animal origin. *J. Appl. Bacteriol.* 69 (1), 30–37, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb02908.x>.
- Haznedaroğlu, B.Z., Zitomer, D.H., Hughes-Strange, G.B., Duran, M., 2005. Whole-cell fatty acid composition of total coliforms to predict sources of fecal contamination. *J. Environ. Eng.* 131 (10), 1426–1432.
- He, X., Liu, P., Zheng, G., Chen, H., Shi, W., Cui, Y., Ren, H., Zhang, X.-X., 2016. Evaluation of five microbial and four mitochondrial DNA markers for tracking human and pig fecal pollution in freshwater. *Sci. Rep.* 6, <https://doi.org/10.1038/srep35311>.
- Heberer, T., 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: A review of recent research data. *Toxicol Lett (Toxicology Letters)* 131 (1-2), 5–17, [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00041-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00041-3).

- Heinz, B., Birk, S., Liedl, R., Geyer, T., Straub, K.L., Andresen, J., Bester, K., Kappler, A., 2009. Water quality deterioration at a karst spring (Gallusquelle, Germany) due to combined sewer overflow: evidence of bacterial and micro-pollutant contamination. *Environ. Geol.* 57 (4), 797–808, <https://doi.org/10.1007/s00254-008-1359-0>.
- Heinz, B., Birk, S., Liedl, R., Geyer, T., Straub, K.L., Bester, K., Kappler, A., 2006. Vulnerability of a karst spring to wastewater infiltration (Gallusquelle, Southwest Germany). *Austrian J. Earth Sci.* 99, 11–17.
- Hembach, N., Schmid, F., Alexander, J., Hiller, C., Rogall, E.T., Schwartz, T., 2017. Occurrence of the *mcr-1* colistin resistance gene and other clinically relevant antibiotic resistance genes in microbial populations at different municipal wastewater treatment plants in Germany. *Front. Microbiol.* 8, 1282, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01282>.
- Hijnen, W.A.M., Beerendonk, E.F., Medema, G.J., 2006. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. *Water Res.* 40 (1), 3–22, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.10.030>.
- Hill, R.T., Straube, W.L., Palmisano, A.C., Gibson, S.L., Colwell, R.R., 1996. Distribution of sewage indicated by *Clostridium perfringens* at a deep-water disposal site after cessation of sewage disposal. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (5), 1741–1746, <https://doi.org/10.1128/aem.62.5.1741-1746.1996>.
- Hill, V.R., Sobsey, M.D., 1998. Microbial indicator reductions in alternative treatment systems for swine wastewater. *Water Sci. Technol.* 38 (12), 119–122, [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(98\)00811-7](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(98)00811-7).
- Hillebrand, O., Nödler, K., Sauter, M., Licha, T., 2015. Multitracer experiment to evaluate the attenuation of selected organic micropollutants in a karst aquifer. *Sci. Total Environ.* 506–507, 338–343, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.102>.
- Hillebrand, O., Nödler, K., Geyer, T., Licha, T., 2014. Investigating the dynamics of two herbicides at a karst spring in Germany: Consequences for sustainable raw water management. *Sci. Total Environ.* 482–483, 193–200, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.02.117>.
- Hillebrand, O., Nödler, K., Licha, T., Sauter, M., Geyer, T., 2012. Caffeine as an indicator for the quantification of untreated wastewater in karst systems. *Water Res.* 46 (2), 395–402, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.003>.
- Hirsch, H.H., Steiger, J., 2003. Polyomavirus BK. *Lancet Infect. Dis.* 3 (10), 611–623, [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00770-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00770-9).
- Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K.-L., 1999. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci. Total Environ.* 225 (1–2), 109–118, [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00337-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00337-4).
- Hu, J., Shi, J., Chang, H., Li, D., Yang, M., Kamagata, Y., 2008. Phenotyping and genotyping of antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from a natural river basin. *Environ. Sci. Technol.* 42 (9), 3415–3420, <https://doi.org/10.1021/es7026746>.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., Zumla, A., 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* 6 (4), 279–284, <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364190>.
- Hulton, C.S.J., Higgins, C.F., Sharp, P.M., 1991. ERIC sequences: A novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.* 5 (4), 825–834, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb00755.x>.
- Hundesda, A., Bofill-Mas, S., Maluquer de Motes, Carlos, Rodriguez-Manzano, J., Bach, A., Casas, M., Girones, R., 2010. Development of a quantitative PCR assay for the quantitation of bovine polyomavirus as a microbial source-tracking tool. *J. Virol. Methods* 163 (2), 385–389, <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.10.029>.
- Hundesda, A., Maluquer de Motes, C., Albinana-Gimenez, N., Rodriguez-Manzano, J., Bofill-Mas, S., Suñen, E., Rosina Girones, R., 2009. Development of a qPCR assay for the quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment. *J. Virol. Methods* 158 (1–2), 130–135, <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.02.006>.
- Hundesda, A., Maluquer de Motes, Carlos, Bofill-Mas, S., Albinana-Gimenez, N., Girones, R., 2006. Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (12), 7886–7893, <https://doi.org/10.1128/AEM.01090-06>.
- Ibekwe, A.M., Ma, J., Murinda, S.E., 2016. Bacterial community composition and structure in an urban river impacted by different pollutant sources. *Sci. Total Environ.* 566–567, 1176–1185, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.168>.
- Ishii, S., Meyer, K.P., Sadowsky, M.J., 2007. Relationship between phylogenetic groups, genotypic clusters, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (18), 5703–5710, <https://doi.org/10.1128/AEM.00275-07>.
- Izbicki, J.A., Swarzenski, P.W., Reich, C.D., Rollins, C., Holden, P.A., 2009. Sources of fecal indicators bacteria in urban streams and ocean beaches, Santa Barbara, California. *Ann. Environ. Sci.* 3, 139–178.

- Jagals, P., Grabow, W.O.K., de Villiers J. C., 1995. Evaluation of indicators for assessment of human and animal faecal pollution of surface run-off. *Water Sci. Technol.* 31 (5-6), 235–241, [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(95\)00272-O](https://doi.org/10.1016/0273-1223(95)00272-O).
- Jeanneau, L., Solecki, O., Wéry, N., Jardé, E., Gourmelon, M., Communal, P.-Y., Jadas-Hécart, A., Caprais, M.-P., Gruau, G., Pourcher, A.-M., 2012. Relative decay of fecal indicator bacteria and human-associated markers: A microcosm study simulating wastewater input into seawater and freshwater. *Environ. Sci. Technol.* 46 (4), 2375–2382, <https://doi.org/10.1021/es203019y>.
- Jenkins, M.B., Hartel, P.G., Olexa, T.J., Stuedemann, J.A., 2003. Putative temporal variability of ribotypes from yearling steers. *J. Environ. Qual.* 32 (1), 305, <https://doi.org/10.2134/eq2003.3050>.
- Jenkins, M.W., Tiwari, S., Lorente, M., Gichaba, C.M., Wuertz, S., 2009. Identifying human and livestock sources of fecal contamination in Kenya with host-specific *Bacteroidales* assays. *Water Res.* 43 (19), 4956–4966, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.07.028>.
- Jeter, S.N., McDermott, C.M., Bower, P.A., Kinzelman, J.L., Bootsma, M.J., Goetz, G.W., McLellan, S.L., 2009. *Bacteroidales* diversity in ring-billed gulls (*Larus delawarensis*) residing at Lake Michigan beaches. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (6), 1525–1533, <https://doi.org/10.1128/AEM.02261-08>.
- Jiang, L., Hu, X., Xu, T., Zhang, H., Sheng, D., Yin, D., 2013. Prevalence of antibiotic resistance genes and their relationship with antibiotics in the Huangpu River and the drinking water sources, Shanghai, China. *Sci. Total Environ.* 458–460, 267–272, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.038>.
- Jiang, S., Noble, R., Chu, W., 2001. Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of Southern California. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (1), 179–184, <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.179-184.2001>.
- Jiang, S.C., 2006. Human adenoviruses in water: Occurrence and health implications: A critical review. *Environ. Sci. Technol.* 40 (23), 7132–7140, <https://doi.org/10.1021/es060892o>.
- Jiang, S.C., Chu, W., Olson, B.H., He, J.-W., Choi, S., Zhang, J., Le, J.Y., Gedalanga, P.B., 2007. Microbial source tracking in a small southern California urban watershed indicates wild animals and growth as the source of fecal bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76 (4), 927–934, <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1047-0>.
- Jiménez-Clavero, M.A., Fernandez, C., Ortiz, J.A., Pro, J., Carbonell, G., Tarazona, J.V., Roblas, N., Ley, V., 2003. Teschoviruses as indicators of porcine fecal contamination of surface water. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (10), 6311–6315, <https://doi.org/10.1128/AEM.69.10.6311-6315.2003>.
- Jin, G., Englande, A.J., Bradford, H., Jeng, H.-W., 2004. Comparison of *E. coli*, enterococci, and fecal coliform as indicators for brackish water quality assessment. *Water Environ. Res.* 76 (3), 245–255, <https://doi.org/10.2175/106143004X141807>.
- Jmaiff Blackstock, L.K., Wawryk, N.J., Jiang, P., Hrukey, S.E., Li, X.-F., 2019. Recent applications and critical evaluation of using artificial sweeteners to assess wastewater impact. *Curr Opin Environ Sci Health (Current Opinion in Environmental Science and Health)* 7, 26–33, <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2018.09.002>.
- Jofre, J., Bosch, A., Lucena, F., Gironés, R., Tartera, C., 1986. Evaluation of *Bacteroides fragilis* bacteriophages as indicators of the virological quality. *Water Sci. Technol.* 18 (10), 167–173, <https://doi.org/10.2166/wst.1986.0126>.
- Johnson, J.R., Johnston, B.D., Delavari, P., Thuras, P., Clabots, C., Sadowsky, M.J., 2017. Phylogenetic backgrounds and virulence-associated traits of *Escherichia coli* isolates from surface waters and diverse animals in Minnesota and Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* 83 (24), <https://doi.org/10.1128/AEM.01329-17>.
- Johnson, L.K., Brown, M.B., Carruthers, E.A., Ferguson, J.A., Dombek, P.E., Sadowsky, M.J., 2004. Sample size, library composition, and genotypic diversity among natural populations of *Escherichia coli* from different animals influence accuracy of determining sources of fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (8), 4478–4485, <https://doi.org/10.1128/AEM.70.8.4478-4485.2004>.
- Kamra, A., Kessie, G., Chen, J.-H., Kalavapudi, S., Shores, R., McElroy, I., Gireesh, T., Sudhakaran, P.R., Dutta, S.K., Nair, P.P., 2005. Exfoliated colonic epithelial cells: Surrogate targets for evaluation of bioactive food components in cancer prevention. *J. Nutr.* 135 (11), 2719–2722, <https://doi.org/10.1093/jn/135.11.2719>.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2 (2), 123–140, <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>.
- Kavka, G.E., Poetsch, E., 2002. Microbiology. Joint Danube Survey – Technical report of the International Commission for the protection of the Danube River., 138–150.
- Khatib, L.A., Tsai, Y.L., Olson, B.H., 2002. A biomarker for the identification of cattle fecal pollution in water using the LTIIa toxin gene from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59 (1), 97–104, <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0959-y>.

- Khatib, L.A., Tsai, Y.L., Olson, B.H., 2003. A biomarker for the identification of swine fecal pollution in water, using the STII toxin gene from enterotoxigenic *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 63 (2), 231–238, <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1373-9>.
- Khazaei, E., Milne-Home, W., 2017. Applicability of geochemical techniques and artificial sweeteners in discriminating the anthropogenic sources of chloride in shallow groundwater north of Toronto, Canada. Environ. Monit. Assess. 189 (5), 1530, <https://doi.org/10.1007/s10661-017-5927-1>.
- Kildare, B.J., Leutenegger, C.M., McSwain, B.S., Bambic, D.G., Rajal, V.B., Wuertz, S., 2007. 16S rRNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific fecal *Bacteroidales*: A Bayesian approach. Water Res. 41 (16), 3701–3715, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.037>.
- King, E.L., Bachoon, D.S., Gates, K.W., 2007. Rapid detection of human fecal contamination in estuarine environments by PCR targeting of *Bifidobacterium adolescentis*. J. Microbiol. Methods 68 (1), 76–81, <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.06.008>.
- Kirs, M., Caffaro-Filho, R.A., Wong, M., Harwood, V.J., Moravcik, P., Fujioka, R.S., 2016. Human-associated *Bacteroides* spp. and human polyomaviruses as microbial source tracking markers in Hawaii. Appl. Environ. Microbiol. 82 (22), 6757–6767, <https://doi.org/10.1128/AEM.01959-16>.
- Kirschner, A.K.T., Eiler, A., Zechmeister, T.C., Velimirov, B., Herzig, A., Mach, R., Farnleitner, A.H., 2002. Extremely productive microbial communities in shallow saline pools respond immediately to changing meteorological conditions. Environ. Microbiol. 4 (9), 546–555, <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00334.x>.
- Koczura, R., Mokracka, J., Barczak, A., Krysiak, N., Kaznowski, A., 2013. Association between the presence of class 1 integrons, virulence genes, and phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolates from river water. Microb. Ecol. 65 (1), 84–90, <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0101-3>.
- Kon, T., Weir, S.C., Howell, E.T., Lee, H., Trevors, J.T., 2009. Repetitive element (REP)-polymerase chain reaction (PCR) analysis of *Escherichia coli* isolates from recreational waters of southeastern Lake Huron. Can. J. Microbiol. 55 (3), 269–276, <https://doi.org/10.1139/w08-123>.
- Kortbaoui, R., Locas, A., Imbeau, M., Payment, P., Villemur, R., 2009. Universal mitochondrial PCR combined with species-specific dot-blot assay as a source-tracking method of human, bovine, chicken, ovine, and porcine in fecal-contaminated surface water. Water Res. 43 (7), 2002–2010, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.01.030>.
- Kramer, M.H., Herwaldt, B.L., Calderon, R.L., Juranek, D.D., 1996. Surveillance of waterborne-disease outbreaks - United States, 1993-1995. MMWR CDC Surveill. Summ. 45 (1), 1–33.
- Kreader, C.A., 1995. Design and evaluation of *Bacteroides* DNA probes for the specific detection of human fecal pollution. Appl. Environ. Microbiol. 61 (4), 1171–1179, <https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1171-1179.1995>.
- Kühn, I., Albert, M.J., Ansaruzzaman, M., Bhuiyan, N.A., Alabi, S.A., Islam, M.S., Neogi, P.K., Huys, G., Janssen, P., Kersters, K., Mollby, R., 1997. Characterization of *Aeromonas* spp. isolated from humans with diarrhea, from healthy controls, and from surface water in Bangladesh. J. Clin. Microbiol. 35 (2), 369–373, <https://doi.org/10.1128/jcm.35.2.369-373.1997>.
- Kuntz, R.L., Hartel, P.G., Rodgers, K., Segars, W.I., 2004. Presence of *Enterococcus faecalis* in broiler litter and wild bird feces for bacterial source tracking. Water Res. 38 (16), 3551–3557, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.05.021>.
- Kurissery, S., Kanavillil, N., Verenitch, S., Mazumder, A., 2012. Caffeine as an anthropogenic marker of domestic waste: A study from lake Simcoe watershed. Ecological Indicators 23, 501–508, <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.05.001>.
- Lamendella, R., Domingo, J.W.S., Oerther, D.B., Vogel, J.R., Stoeckel, D.M., 2007. Assessment of fecal pollution sources in a small northern-plains watershed using PCR and phylogenetic analyses of *Bacteroidetes* 16S rRNA gene. FEMS Microbiol. Ecol. 59 (3), 651–660, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00211.x>.
- LaMontagne, M.L., Griffith, J.F., Holden, P.A., 2003. Comparative analysis of animal fecal bacterial communities using restriction fragment length polymorphisms of bacterial 16S rDNA PCR-amplified from fecal community DNA. American Society for Microbiology General Meeting.
- Lange, F.T., Scheurer, M., Brauch, H.-J., 2012. Artificial sweeteners - a recently recognized class of emerging environmental contaminants: A review. Anal. Bioanal. Chem. 403 (9), 2503–2518, <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5892-z>.
- Layton, B.A., McKay, L., Williams, D., Garrett, V., Gentry, R., Sayler, G., 2006. Development of *Bacteroides* 16S rRNA gene TaqMan-based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water. Appl. Environ. Microbiol. 72 (6), 4214–4224, <https://doi.org/10.1128/AEM.01036-05>.

- Layton, B.A., Walters, S.P., Boehm, A.B., 2009. Distribution and diversity of the enterococcal surface protein (esp) gene in animal hosts and the Pacific coast environment. *J. Appl. Microbiol.* 106 (5), 1521–1531, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04113.x>.
- Layton, B.A., Walters, S.P., Lam, L.H., Boehm, A.B., 2010. *Enterococcus* species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. *J. Appl. Microbiol.* 109 (2), 539–547, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04675.x>.
- Leclerc, H., Devriese, L.A., Mossel, D., 1996. Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: Consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. *J. Appl. Bacteriol.* 81 (5), 459–466, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb03533.x>.
- Lee, D.-Y., Weir, S.C., Lee, H., Trevors, J.T., 2010. Quantitative identification of fecal water pollution sources by TaqMan real-time PCR assays using *Bacteroidales* 16S rRNA genetic markers. *Appl. Environ. Microbiol.* 88 (6), 1373–1383, <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2880-0>.
- Lee, J.E., Lee, H., Cho, Y.-H., Hur, H.-G., Ko, G., 2011. F+ RNA coliphage-based microbial source tracking in water resources of South Korea. *Sci. Total Environ.* 412–413, 127–131, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.09.061>.
- Lee, S.H., Levy, D.A., Craun, G.F., Beach, M.J., Calderon, R.L., 2002. Surveillance of waterborne-disease outbreaks - United States, 1999–2000. *MMWR CDC Surveill. Summ.* 51 (8), 1–45.
- Leung, K.T., Mackereth, R., Tien, Y.-C., Topp, E., 2004. A comparison of AFLP and ERIC-PCR analyses for discriminating *Escherichia coli* from cattle, pig and human sources. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47 (1), 111–119, [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00254-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00254-X).
- Levy, D.A., Bens, M.S., Craun, G.F., Calderon, R.L., Herwaldt, B.L., 1998. Surveillance for waterborne-disease outbreaks - United States, 1995–1996. *MMWR CDC Surveill. Summ.* 47 (5), 1–34.
- Ley, R.E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P., Ramey, R.R., Bircher, J.S., Schlegel, M.L., Tucker, T.A., Schrenzel, M.D., Knight, R., Gordon, J.I., 2008a. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* 320 (5883), 1647–1651, <https://doi.org/10.1126/science.1155725>.
- Ley, R.E., Lozupone, C.A., Hamady, M., Knight, R., Gordon, J.I., 2008b. Worlds within worlds: Evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 776–788, <https://doi.org/10.1038/nrmicro1978>.
- Ley, R.E., Peterson, D.A., Gordon, J.I., 2006. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 124 (4), 837–848, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.017>.
- Ley, V., Higgins, J., Fayer, R., 2002. Bovine enteroviruses as indicators of fecal contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (7), 3455–3461, <https://doi.org/10.1128/AEM.68.7.3455-3461.2002>.
- Li, L.-G., Yin, X., Zhang, T., 2018. Tracking antibiotic resistance gene pollution from different sources using machine-learning classification. *Microbiome* 6 (1), 422, <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0480-x>.
- Li, X., Harwood, V.J., Nayak, B., Staley, C., Sadowsky, M.J., Weidhaas, J., 2015. A novel microbial source tracking microarray for pathogen detection and fecal source identification in environmental systems. *Environ. Sci. Technol.* 49 (12), 7319–7329, <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00980>.
- Li, X., Harwood, V.J., Nayak, B., Weidhaas, J.L., 2016. Ultrafiltration and microarray for detection of microbial source tracking marker and pathogen genes in riverine and marine systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 82 (5), 1625–1635, <https://doi.org/10.1128/AEM.02583-15>.
- Liang, L., Goh, S.H., Gin, K.Y.H., 2017. Decay kinetics of microbial source tracking (MST) markers and human adenovirus under the effects of sunlight and salinity. *Sci. Total Environ.* 574, 165–175, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.031>.
- Liang, Z., He, Z., Zhou, X., Powell, C.A., Yang, Y., Roberts, M.G., Stoffella, P.J., 2012. High diversity and differential persistence of fecal *Bacteroidales* population spiked into freshwater microcosm. *Water Res.* 46 (1), 247–257, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.004>.
- Lin, C., Miller, T.L., 1998. Phylogenetic analysis of *Methanobrevibacter* isolated from feces of humans and other animals. *Arch. Microbiol.* 169 (5), 397–403, <https://doi.org/10.1007/s0020300050589>.
- Lindsey, M.E., Meyer, M., Thurman, E.M., 2001. Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem (Analytical Chemistry)* 73 (19), 4640–4646, <https://doi.org/10.1021/ac010514w>.
- Lipp, E.K., Kurz, R., Vincent, R., Rodriguez-Palacios, C., Farrah, S.R., Rose, J.B., 2001a. The effects of seasonal variability and weather on microbial fecal pollution and enteric pathogens in a subtropical estuary. *Estuaries* 24 (2), 266, <https://doi.org/10.2307/1352950>.
- Lipp, E.K., Lukasik, J., Rose, J.B., 2001b. Human enteric viruses and parasites in the marine environment, in: Paul, J.H. (Ed.), *Marine microbiology*, vol. 30. *Methods in Microbiology* 30. Acad. Press, San Diego, Calif., pp. 559–588.

- Liu, C., Song, Y., McTeague, M., Vu, A.W., Wexler, H., Finegold, S.M., 2003. Rapid identification of the species of the *Bacteroides fragilis* group by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers. FEMS Microbiol. Lett. 222 (1), 9–16, [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00296-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00296-9).
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H., Forney, L.J., 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 63 (11), 4516–4522, <https://doi.org/10.1128/aem.63.11.4516-4522.1997>.
- Liu, Y.-Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.-X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.-F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J.-H., Shen, J., 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. Lancet Infect. Dis. 16 (2), 161–168, [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7).
- Lodder, W.J., Roda Husman, A.M. de, 2005. Presence of noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in the Netherlands. Appl. Environ. Microbiol. 71 (3), 1453–1461, <https://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1453-1461.2005>.
- Love, D.C., Sobsey, M.D., 2007. Simple and rapid F+ coliphage culture, Latex agglutination, and typing assay to detect and source track fecal contamination. Appl. Environ. Microbiol. 73 (13), 4110–4118, <https://doi.org/10.1128/AEM.02546-06>.
- Lu, J., Santo Domingo, J., Shanks, O.C., 2007. Identification of chicken-specific fecal microbial sequences using a metagenomic approach. Water Res. 41 (16), 3561–3574, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.05.033>.
- Lu, J., Santo Domingo, J.W., Lamendella, R., Edge, T., Hill, S., 2008. Phylogenetic diversity and molecular detection of bacteria in gull feces. Appl. Environ. Microbiol. 74 (13), 3969–3976, <https://doi.org/10.1128/AEM.00019-08>.
- Lu, L., Hume, M.E., Sternes, K.L., Pillai, S.D., 2004. Genetic diversity of *Escherichia coli* isolates in irrigation water and associated sediments: Implications for source tracking. Water Res. 38 (18), 3899–3908, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.06.020>.
- Lucena, F., Mendez, X., Moron, A., Calderon, E., Campos, C., Guerrero, A., Cardenas, M., Gantzer, C., Schwartzbrod, L., Skrabber, S., Jofre, J., 2003. Occurrence and densities of bacteriophages proposed as indicators and bacterial indicators in river waters from Europe and South America. J. Appl. Microbiol. 94 (5), 808–815, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01812.x>.
- Luo, Y., Mao, D., Rysz, M., Zhou, Q., Zhang, H., Xu, L., J J Alvarez, P., 2010. Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China. Environ. Sci. Technol. 44 (19), 7220–7225, <https://doi.org/10.1021/es100233w>.
- Maidak, B.L., Cole, J.R., Lilburn, T.G., Parker, C.T., Saxman, P.R., Farris, R.J., Garrity, G.M., Olsen, G.J., Schmidt, T.M., Tiedje, J.M., 2001. The RDP-II (Ribosomal Database Project). Nucl. Acids Res. 29 (1), 173–174, <https://doi.org/10.1093/nar/29.1.173>.
- Mainil, J.G., Daube, G., 2005. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: Who's who? J. Appl. Microbiol. 98 (6), 1332–1344, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02653.x>.
- Mara, D.D., Oragui, J., 1985. Bacteriological methods for distinguishing between human and animal faecal pollution of water: Results of fieldwork in Nigeria and Zimbabwe. Bull. World Health Organ. 63 (4), 773–783.
- Mara, D.D., Oragui, J.I., 1981. Occurrence of *Rhodococcus coprophilus* and associated actinomycetes in feces, sewage, and freshwater. Appl. Environ. Microbiol. 42 (6), 1037–1042, <https://doi.org/10.1128/aem.42.6.1037-1042.1981>.
- Mara, D.D., Oragui, J.I., 1983. Sorbitol-fermenting *Bifidobacteria* as specific indicators of human faecal pollution. J. Appl. Bacteriol. 55 (2), 349–357, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1983.tb01331.x>.
- Martellini, A., Payment, P., Villemur, R., 2005. Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate human, bovine, porcine and ovine sources in fecally contaminated surface water. Water Res. 39 (4), 541–548, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.11.012>.
- Marti, R., Gannon, V.P.J., Jokinen, C., Lanthier, M., Lapen, D.R., Neumann, N.F., Ruecker, N.J., Scott, A., Wilkes, G., Zhang, Y., Topp, E., 2013. Quantitative multi-year elucidation of fecal sources of waterborne pathogen contamination in the South Nation River basin using *Bacteroidales* microbial source tracking markers. Water Res. 47 (7), 2315–2324, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.02.009>.
- Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Walker, J., Mitchell, T., Andrew, P., Prudhomme, M., Alloing, G., Hakenbeck, R., 1992. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. Nucl. Acids Res. 20 (13), 3479–3483, <https://doi.org/10.1093/nar/20.13.3479>.
- Masters, N., Wiegand, A., Ahmed, W., Katouli, M., 2011. *Escherichia coli* virulence genes profile of surface waters as an indicator of water quality. Water Res. 45 (19), 6321–6333, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.09.018>.

- Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Kado, Y., Takada, T., Matsumoto, K., Tanaka, R., 2004. Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal *Bifidobacteria*. Appl. Environ. Microbiol. 70 (1), 167–173, <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.167-173.2004>.
- McCance, W., Jones, O., Edwards, M., Surapaneni, A., Chadalavada, S., Currell, M., 2018. Contaminants of emerging concern as novel groundwater tracers for delineating wastewater impacts in urban and peri-urban areas. Water Res. 146, 118–133, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.09.013>.
- McLellan, S.L., Daniels, A.D., Salmore, A.K., 2003. Genetic characterization of *Escherichia coli* populations from host sources of fecal pollution by using DNA fingerprinting. Appl. Environ. Microbiol. 69 (5), 2587–2594, <https://doi.org/10.1128/AEM.69.5.2587-2594.2003>.
- McMinn, B.R., Ashbolt, N.J., Korajkic, A., 2017. Bacteriophages as indicators of faecal pollution and enteric virus removal. Lett. Appl. Microbiol. 65 (1), 11–26, <https://doi.org/10.1111/lam.12736>.
- McMinn, B.R., Korajkic, A., Ashbolt, N.J., 2014. Evaluation of *Bacteroides fragilis* GB-124 bacteriophages as novel human-associated faecal indicators in the United States. Lett. Appl. Microbiol. 59 (1), 115–121, <https://doi.org/10.1111/lam.12252>.
- McQuaig, S.M., Scott, T.M., Lukasik, J.O., Paul, J.H., Harwood, V.J., 2009. Quantification of human polyomaviruses JC virus and BK virus by TaqMan quantitative PCR and comparison to other water quality indicators in water and fecal samples. Appl. Environ. Microbiol. 75 (11), 3379–3388, <https://doi.org/10.1128/AEM.02302-08>.
- Meays, C.L., Broersma, K., Nordin, R., Mazumder, A., 2004. Source tracking fecal bacteria in water: A critical review of current methods. J. Environ. Manage. 73 (1), 71–79, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2004.06.001>.
- Mieszkis, S., Furet, J.-P., Corthier, G., Gourmelon, M., 2009. Estimation of pig fecal contamination in a river catchment by real-time PCR using two pig-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genetic markers. Appl. Environ. Microbiol. 75 (10), 3045–3054, <https://doi.org/10.1128/AEM.02343-08>.
- Monteiro, J., Widen, R.H., Pignatari, A.C.C., Kubasek, C., Silbert, S., 2012. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. J. Antimicrob. Chemother. 67 (4), 906–909, <https://doi.org/10.1093/jac/dkr563>.
- Moore, D.F., Harwood, V.J., Ferguson, D.M., Lukasik, J., Hannah, P., Getrich, M., Brownell, M., 2005. Evaluation of antibiotic resistance analysis and ribotyping for identification of faecal pollution sources in an urban watershed. J. Appl. Microbiol. 99 (3), 618–628, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02612.x>.
- Moussa, S.H., Massengale, R.D., 2008. Identification of the sources of *Escherichia coli* in a watershed using carbon-utilization patterns and composite data sets. J. Water Health 6 (2), 197–207, <https://doi.org/10.2166/wh.2008.021>.
- Munday, C.J., Xiong, J., Li, C., Shen, D., Hawkey, P.M., 2004. Dissemination of CTX-M type beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* isolates in the People's Republic of China. Int. J. Antimicrob. Agents 23 (2), 175–180, <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2003.07.004>.
- Murtaugh, J.J., Bunch, R.L., 1967. Sterols as measure of fecal pollution. Journal (Water Pollution Federation) 3 (39), 404–409.
- Mushi, D., Byamukama, D., Kivaisi, A.K., Mach, R.L., Farnleitner, A.H., 2010. Sorbitol-fermenting *Bifidobacteria* are indicators of very recent human faecal pollution in streams and groundwater habitats in urban tropical lowlands. J. Water Health 8 (3), 466–478, <https://doi.org/10.2166/wh.2010.116>.
- Muyzer, G., Smalla, K., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie van Leeuwenhoek 73 (1), 127–141, <https://doi.org/10.1023/A:1000669317571>.
- Muyzer, G., Waal, E.C. de, Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59 (3), 695–700, <https://doi.org/10.1128/aem.59.3.695-700.1993>.
- Myoda, S.P., Carson, C. A., Furmann, J. J., Hahm, B.K., Hartel, P.G., Yampara-Iquise, H., Johnson, L.A., Kuntz, R.L., Nakatsu, C.H., Sadowsky, M.J., Samadpour, M., 2003. Comparison of genotypic based microbial source tracking methods requiring a host origin database. J. Water Health 1 (4), 167–180.
- Neave, M., Luter, H., Padovan, A., Townsend, S., Schobben, X., Gibb, K., 2014. Multiple approaches to microbial source tracking in tropical northern Australia. MicrobiologyOpen 3 (6), 860–874, <https://doi.org/10.1002/mbo3.209>.
- Nebra, Y., Bonjoch, X., Blanch, A.R., 2003. Use of *Bifidobacterium dentium* as an indicator of the origin of fecal water pollution. Appl. Environ. Microbiol. 69 (5), 2651–2656, <https://doi.org/10.1128/AEM.69.5.2651-2656.2003>.
- Newton, R.J., VandeWalle, J.L., Borchardt, M.A., Gorelick, M.H., McLellan, S.L., 2011. *Lachnospiraceae* and *Bacteroidales* alternative fecal indicators reveal chronic human sewage contamination in an urban harbor. Appl. Environ. Microbiol. 77 (19), 6972–6981, <https://doi.org/10.1128/AEM.05480-11>.

- Nieman, J., Brion, G.M., 2003. Novel bacterial ratio for predicting faecal age. *Water Sci. Technol.* 47 (3), 45–49, <https://doi.org/10.2166/wst.2003.0157>.
- Noble, R.T., Allen, S.M., Blackwood, A.D., Chu, W., Jiang, S.C., Lovelace, G.L., Sobsey, M.D., Stewart, J.R., Wait, D.A., 2003. Use of viral pathogens and indicators to differentiate between human and non-human fecal contamination in a microbial source tracking comparison study. *J. Water Health* 1 (4), 195–207.
- Nocker, A., Burr, M., Camper, A.K., 2007. Genotypic microbial community profiling: A critical technical review. *Microb. Ecol.* 54 (2), 276–289, <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9199-5>.
- Nödler, K., Hillebrand, O., Idzik, K., Strathmann, M., Schiperski, F., Zirlwagen, J., Licha, T., 2013. Occurrence and fate of the angiotensin II receptor antagonist transformation product valsartan acid in the water cycle - a comparative study with selected beta-blockers and the persistent anthropogenic wastewater indicators carbamazepine and acesulfame. *Water Res.* 47 (17), 6650–6659, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.08.034>.
- Nödler, K., Tsakiri, M., Aloupi, M., Gatidou, G., Stasinakis, A.S., Licha, T., 2016. Evaluation of polar organic micropollutants as indicators for wastewater-related coastal water quality impairment. *Environ Pollut* 211, 282–290, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.01.014>.
- Nolan, T., Hands, R.E., Bustin, S.A., 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protoc.* 1 (3), 1559–1582, <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.236>.
- Nontongana, N., Sibanda, T., Ngwenya, E., Okoh, A.I., 2014. Prevalence and antibiogram profiling of *Escherichia coli* pathotypes isolated from the Kat River and the Fort Beaufort abstraction water. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 11 (8), 8213–8227, <https://doi.org/10.3390/ijerph110808213>.
- Ogorzaly, L., Bertrand, I., Paris, M., Maul, A., Gantzer, C., 2010. Occurrence, survival, and persistence of human adenoviruses and F-specific RNA phages in raw groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (24), 8019–8025, <https://doi.org/10.1128/AEM.00917-10>.
- Ogorzaly, L., Tissier, A., Bertrand, I., Maul, A., Gantzer, C., 2009. Relationship between F-specific RNA phage genogroups, faecal pollution indicators and human adenoviruses in river water. *Water Res.* 43 (5), 1257–1264, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.12.011>.
- Ohad, S., Vaizel-Ohayon, D., Rom, M., Guttman, J., Berger, D., Kravitz, V., Pilo, S., Huberman, Z., Kashi, Y., Rorman, E., 2015. Microbial source tracking in adjacent karst springs. *Appl. Environ. Microbiol.* 81 (15), 5037–5047, <https://doi.org/10.1128/AEM.00855-15>.
- Okabe, S., Okayama, N., Savichtcheva, O., Ito, T., 2007. Quantification of host-specific *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers for assessment of fecal pollution in freshwater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74 (4), 890–901, <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0714-x>.
- Okabe, S., Shimazu, Y., 2007. Persistence of host-specific *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers in environmental waters: Effects of temperature and salinity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76 (4), 935–944, <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1048-z>.
- Olaitan, A.O., Li, J., 2016. Emergence of polymyxin resistance in Gram-negative bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents* 48 (6), 581–582, <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.11.003>.
- Olivas, Y., Faulkner, B.R., 2008. Fecal source tracking by antibiotic resistance analysis on a watershed exhibiting low resistance. *Environ. Monit. Assess.* 139 (1-3), 15–25, <https://doi.org/10.1007/s10661-007-9805-0>.
- Olive, D.M., Bean, P., 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.* 37 (6), 1661–1669.
- Oshiro, R.K., Olson, B.H., 1997. Occurrence of STh toxin gene in wastewater. *Coliforms and E. coli: problem or solution?* The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 255–259.
- Otto, J., Jurzik, L., Schneider, M., Stange, C., Hamza, I., Preuß, G., Tiehm, A., 2015. Entwicklung und Validierung von molekularbiologischen PCR-Methoden zum quantitativen Nachweis von hygienerelevanten Bakterien und Viren im Wasser. *Energie| Wasser-Praxis* 10, 58–62.
- Ottoson, J.R., 2009. Bifidobacterial survival in surface water and implications for microbial source tracking. *Can. J. Microbiol.* 55 (6), 642–647, <https://doi.org/10.1139/w09-007>.
- Ovejero, C.M., Delgado-Blas, J.F., Calero-Caceres, W., Muniesa, M., Gonzalez-Zorn, B., 2017. Spread of *mcr-1*-carrying *Enterobacteriaceae* in sewage water from Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 72 (4), 1050–1053, <https://doi.org/10.1093/jac/dkw533>.
- Parveen, S., Hodge, N.C., Stall, R.E., Farrah, S.R., Tamplin, M.L., 2001. Phenotypic and genotypic characterization of human and nonhuman *Escherichia coli*. *Water Res.* 35 (2), 379–386, [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00269-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00269-4).

- Parveen, S., Portier, K.M., Robinson, K., Edmiston, L., Tamplin, M.L., 1999. Discriminant analysis of ribotype profiles of *Escherichia coli* for differentiating human and nonhuman sources of fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (7), 3142–3147.
- Paton, J.C., Paton, A.W., 1998. Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 11 (3), 450–479.
- Pavel, A.B., Vasile, C.I., 2012. PyElph - a software tool for gel images analysis and phylogenetics. *BMC Bioinformatics* 13, 9, <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-9>.
- Payan, A., Ebdon, J., Taylor, H., Gantzer, C., Ottoson, J., Papageorgiou, G.T., Blanch, A.R., Lucena, F., Jofre, J., Muniesa, M., 2005. Method for isolation of *Bacterioides* bacteriophage host strains suitable for tracking sources of fecal pollution in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (9), 5659–5662, <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5659-5662.2005>.
- Pei, R., Kim, S.-C., Carlson, K.H., Pruden, A., 2006. Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). *Water Res.* 40 (12), 2427–2435, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.04.017>.
- Pina, S., Puig, Montserrat, Lucena, Francisco, Jofre, J., Girones, R., 1998. Viral pollution in the environment and in shellfish: Human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (9), 3376–3382.
- Polo, C., Pérez, J.L., Mielnichuck, A., Fedele, C.G., Niubò, J., Tenorio, A., 2004. Prevalence and patterns of polyomavirus urinary excretion in immunocompetent adults and children. *Clin. Microbiol. Infect.* 10 (7), 640–644, <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00882.x>.
- Poole, K., 2004. Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* 61 (17), 2200–2223, <https://doi.org/10.1007/s00018-004-0460-9>.
- Pourcher, A.-M., Devriese, L.A., Hernandez, J.F., Delattre, J.M., 1991. Enumeration by a miniaturized method of *Escherichia coli*, *Streptococcus bovis* and enterococci as indicators of the origin of faecal pollution of waters. *J. Appl. Bacteriol.* 70 (6), 525–530, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb02752.x>.
- Price, B., Venso, E., Frana, M., Greenberg, J., Ware, A., 2007. A comparison of ARA and DNA data for microbial source tracking based on source-classification models developed using classification trees. *Water Res.* 41 (16), 3575–3584, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.05.026>.
- Pronk, M., Goldscheider, N., Zopfi, J., 2006. Dynamics and interaction of organic carbon, turbidity and bacteria in a karst aquifer system. *Hydrogeol. J.* 14 (4), 473–484, <https://doi.org/10.1007/s10040-005-0454-5>.
- Pronk, M., Goldscheider, N., Zopfi, J., 2007. Particle-size distribution as indicator for fecal bacteria contamination of drinking water from karst springs. *Environ. Sci. Technol.* 41 (24), 8400–8405.
- Qian, J., Zheng, H., Wang, P., Liao, X., Wang, C., Li, K., Liu, J., Lu, B., Tian, X., Yuan, W., 2017. Water sources of riparian plants during a rainy season in Taihu Lake Basin, China: A stable isotope study. *Chem. Spec. Bioavailab.* 29 (1), 153–160, <https://doi.org/10.1080/09542299.2017.1373035>.
- Raith, M.R., Kelty, C.A., Griffith, J.F., Schriewer, A., Wuertz, S., Mieszkina, S., Gourmelon, M., Reischer, G.H., Farnleitner, A.H., Ervin, J.S., Holden, P.A., Ebentier, D.L., Jay, J.A., Wang, D., Boehm, A.B., Aw, T.G., Rose, J.B., Balleste, E., Meijer, W.G., Sivaganesan, M., Shanks, O.C., 2013. Comparison of PCR and quantitative real-time PCR methods for the characterization of ruminant and cattle fecal pollution sources. *Water Res.* 47 (18), 6921–6928, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.03.061>.
- Ram, J.L., Ritchie, R.P., Fang, J., Gonzales, F.S., Selegue, J.P., 2004. Sequence-based source tracking of based on genetic diversity of β -glucuronidase. *J. Environ. Qual.* 33 (3), 1024, <https://doi.org/10.2134/jeq2004.1024>.
- Ram, S., Vajpayee, P., Tripathi, U., Singh, R.L., Seth, P.K., Shanker, R., 2008. Determination of antimicrobial resistance and virulence gene signatures in surface water isolates of *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol.* 105 (6), 1899–1908, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03879.x>.
- Rawat, D., Nair, D., 2010. Extended-spectrum β -lactamases in Gram negative bacteria. *J. Glob. Infect. Dis.* 2 (3), 263–274, <https://doi.org/10.4103/0974-777X.68531>.
- Reischer, G.H., Haider, J.M., Sommer, R., Stadler, H., Keiblinger, K.M., Hornek, R., Zerobin, W., Mach, R.L., Farnleitner, A.H., 2008. Quantitative microbial faecal source tracking with sampling guided by hydrological catchment dynamics. *Environ. Microbiol.* 10 (10), 2598–2608, <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01682.x>.
- Reischer, G.H., Kasper, D.C., Steinborn, R., Farnleitner, A.H., Mach, R.L., 2007. A quantitative real-time PCR assay for the highly sensitive and specific detection of human faecal influence in spring water from a large alpine catchment area. *Lett. Appl. Microbiol.* 44 (4), 351–356, <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02094.x>.

- Reischer, G.H., Kasper, D.C., Steinborn, R., Mach, R.L., Farnleitner, A.H., 2006. Quantitative PCR method for sensitive detection of ruminant fecal pollution in freshwater and evaluation of this method in alpine karstic regions. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (8), 5610–5614, <https://doi.org/10.1128/AEM.00364-06>.
- Reischer, G.H., Kollanur, D., Vierheilig, J., Wehrspau, C., Mach, R.L., Sommer, R., Stadler, H., Farnleitner, A.H., 2011. Hypothesis-driven approach for the identification of fecal pollution sources in water resources. *Environ. Sci. Technol.* 45 (9), 4038–4045, <https://doi.org/10.1021/es103659s>.
- Resnick, I.G., Levin, M.A., 1981. Quantitative procedure for enumeration of *Bifidobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.* 42 (3), 427–432, <https://doi.org/10.1128/aem.42.3.427-432.1981>.
- Rhodes, M.W., Kator, H., 1999. Sorbitol-fermenting *Bifidobacteria* as indicators of diffuse human faecal pollution in estuarine watersheds. *J. Appl. Microbiol.* 87 (4), 528–535, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00845.x>.
- Robertson, W.D., van Stempvoort, D.R., Solomon, D. K., Homewood, J., Brwon, S.J., Spoelstra, J., Schiff, S. L., 2013. Persistence of artificial sweeteners in a 15-year-old septic system plume. *J Hydrol* 477, 43–54, <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2012.10.048>.
- Roder Green, A.L., Putschew, A., Nehls, T., 2014. Littered cigarette butts as a source of nicotine in urban waters. *J Hydrol Part D* (519), 3466–3474.
- Rolain, J.M., Parola, P., Cornaglia, G., 2010. New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): Towards a new pandemia? *Clin. Microbiol. Infect.* 16 (12), 1699–1701, <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03385.x>.
- Rose, C., Parker, A., Jefferson, B., Cartmell, E., 2015. The characterization of feces and urine: A review of the literature to inform advanced treatment technology. *Crit Rev Environ Sci Technol* 45 (17), 1827–1879, <https://doi.org/10.1080/10643389.2014.1000761>.
- Roslev, P., Bjergbaek, L.A., Hesselsoe, M., 2004. Effect of oxygen on survival of faecal pollution indicators in drinking water. *J. Appl. Microbiol.* 96 (5), 938–945, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02209.x>.
- Roslev, P., Bukh, A.S., 2011. State of the art molecular markers for fecal pollution source tracking in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 89 (5), 1341–1355, <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3080-7>.
- Rothernheber, D., Jones, S., 2018. Enterococcal concentrations in a coastal ecosystem are a function of recal source input, environmental conditions, and environmental sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 84 (17), <https://doi.org/10.1128/AEM.01038-18>.
- Rowbotham, T. J., CROSS, T., 1977. Ecology of *Rhodococcus coprophilus* and associated *Actinomycetes* in fresh water and agricultural habitats. *J. Gen. Microbiol.* 100 (2), 231–240, <https://doi.org/10.1099/00221287-100-2-231>.
- Rusiñol, M., Carratalà, A., Hundesa, A., Bach, A., Kern, A., Vantarakis, A., Girones, R., Bofill-Mas, S., 2013. Description of a novel viral tool to identify and quantify ovine faecal pollution in the environment. *Sci. Total Environ.* 458–460, 355–360, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.028>.
- Ryan, M., Meiman, J., 1996. An examination of short-term variations in water quality at a karst spring in Kentucky. *Groundwater* 34 (1), 23–30, <https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.1996.tb01861.x>.
- Samadpour, M., Roberts, M.C., Kitts, C., Mulugeta, W., Alfi, D., 2005. The use of ribotyping and antibiotic resistance patterns for identification of host sources of *Escherichia coli* strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 40 (1), 63–68, <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01630.x>.
- Sauter, M., 1992. Quantification and forecasting of regional groundwater flow and transport in a karst aquifer (Gallusquelle, Malm, SW. Germany). *Tübinger Geowissenschaftliche Arbeiten*, C13, Tübingen.
- Savichtcheva, O., Okayama, N., Okabe, S., 2007. Relationships between *Bacteroides* 16S rRNA genetic markers and presence of bacterial enteric pathogens and conventional fecal indicators. *Water Res.* 41 (16), 3615–3628, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.03.028>.
- Savill, M.G., Murray, S.R., Scholes, P., Maas, E.W., McCormick, R.E., Moore, E.B., Gilpin, B.J., 2001. Application of polymerase chain reaction (PCR) and TaqMan PCR techniques to the detection and identification of *Rhodococcus coprophilus* in faecal samples. *J. Microbiol. Methods* 47 (3), 355–368, [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00343-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00343-8).
- Schaper, M., Jofre, J., Uys, M., Grabow, W., 2002. Distribution of genotypes of F-specific RNA bacteriophages in human and non-human sources of faecal pollution in South Africa and Spain. *J. Appl. Microbiol.* 92 (4), 657–667, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01600.x>.
- Schijven, J.F., Bruin, H. de, Hassanizadeh, S.M., Roda Husman, A.M. de, 2003. Bacteriophages and *Clostridium* spores as indicator organisms for removal of pathogens by passage through saturated dune sand. *Water Res.* 37 (9), 2186–2194, [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00627-9](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00627-9).
- Schill, W.B., Mathes, M.V., 2008. Real-time PCR detection and quantification of nine potential sources of fecal contamination by analysis of mitochondrial cytochrome B targets. *Environ. Sci. Technol.* 42 (14), 5229–5234, <https://doi.org/10.1021/es800051z>.

- Schipperski, F., Zirlwagen, J., Hillebrand, O., Licha, T., Scheytt, T., 2015a. Preliminary results on the dynamics of particles and their size distribution at a karst spring during a snowmelt event. *J Hydrol* 524, 326–332, <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2015.02.035>.
- Schipperski, F., Zirlwagen, J., Hillebrand, O., Nödler, K., Licha, T., Scheytt, T., 2015b. Relationship between organic micropollutants and hydro-sedimentary processes at a karst spring in south-west Germany. *Sci. Total Environ.* 532, 360–367, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.007>.
- Schmidt, K.R., der Beek, T.A., Dai, X., Dong, B., Dopp, E., Eichinger, F., Hammers-Wirtz, M., Haußmann, R., Holbach, A., Hollert, H., Illgen, M., Jiang, X., Koehler, J., Koester, S., Korth, A., Kueppers, S., Li, A., Lohmann, M., Moldaenke, C., Norra, S., Qin, B., Qin, Y., Reese, M., Riehle, E., Santiago-Schuebel, B., Schaefer, C., Simon, A., Song, Y., Staaks, C., Steinhardt, J., Subklew, G., Tao, T., Wu, T., Yin, D., Zhao, F., Zheng, B., Zhou, M., Zou, H., Zuo, J., Tiehm, A., 2016. Since 2015 the SinoGerman research project SIGN supports water quality improvement in the Taihu region, China. *Environ. Sci. Eur.* 28 (1), 24, <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0092-Z>.
- Schriewer, A., Miller, W.A., Byrne, B.A., Miller, M.A., Oates, S., Conrad, P.A., Hardin, D., Yang, H.-H., Chouicha, N., Melli, A., Jessup, D., Dominik, C., Wuertz, S., 2010. Presence of Bacteroidales as a predictor of pathogens in surface waters of the central California coast. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (17), 5802–5814, <https://doi.org/10.1128/AEM.00635-10>.
- Schubert, S., Wieser, A., 2010. MALDI-TOF-MS in der mikrobiologischen Diagnostik. *Biospektrum* 16 (7), 760–762.
- Schutter, M.E., Dick, R.P., 2000. Comparison of fatty acid methyl ester (FAME) methods for characterizing microbial communities. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64 (5), 1659, <https://doi.org/10.2136/sssaj2000.6451659x>.
- Schwartz, D.C., Cantor, C.R., 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37 (1), 67–75, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90301-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90301-5).
- Schwarzenbach, R.P., Escher, B.I., Fenner, K., Hofstetter, T.B., Johnson, C.A., Gunten, U. von, Wehrl, B., 2006. Global hydrological cycles and world water resources. *Science* 313 (5790), 1072–1077, <https://doi.org/10.1126/science.1128845>.
- Scott, T.M., Harwood, V.J., Ahmed, W., Masago, Y., Rose, J.B., 2009. Comment on “Environmental occurrence of the enterococcal surface protein (esp) gene is an unreliable indicator of human fecal contamination”. *Environ. Sci. Technol.* 43 (16), 6434–6435, <https://doi.org/10.1021/es901282x>.
- Scott, T.M., Jenkins, T.M., Lukasik, J., Rose, J.B., 2005. Potential use of a host associated molecular marker in *Enterococcus faecium* as an index of human fecal pollution. *Environ. Sci. Technol.* 39 (1), 283–287, <https://doi.org/10.1021/es035267n>.
- Scott, T.M., Rose, J.B., Jenkins, T.M., Farrah, S.R., Lukasik, J., 2002. Microbial source tracking: Current methodology and future directions. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (12), 5796–5803, <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.5796-5803.2002>.
- Seurinck, S., Defoirdt, T., Verstraete, W., Siciliano, S.D., 2005. Detection and quantification of the human-specific HF183 *Bacteroides* 16S rRNA genetic marker with real-time PCR for assessment of human faecal pollution in freshwater. *Environ. Microbiol.* 7 (2), 249–259, <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00702.x>.
- Seurinck, S., Verdriel, M., Verstraete, W., Siciliano, S.D., 2006. Identification of human fecal pollution sources in a coastal area: A case study at Oostende (Belgium). *J. Water Health* 4 (2), 167–175, <https://doi.org/10.2166/wh.2006.0014>.
- Seurinck, S., Verstraete, W., Siciliano, S.D., 2003. Use of 16S-23S rRNA intergenic spacer region PCR and repetitive extragenic palindromic PCR analyses of *Escherichia coli* isolates to identify nonpoint fecal sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (8), 4942–4950, <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4942-4950.2003>.
- Shanks, O.C., Atikovic, E., Blackwood, A.D., Lu, J., Noble, R.T., Domingo, J.S., Seifring, S., Sivaganesan, M., Haugland, R.A., 2008. Quantitative PCR for detection and enumeration of genetic markers of bovine fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (3), 745–752, <https://doi.org/10.1128/AEM.01843-07>.
- Shanks, O.C., Domingo, J.W.S., Lu, J., Kelty, C.A., Graham, J.E., 2007. Identification of bacterial DNA markers for the detection of human fecal pollution in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (8), 2416–2422, <https://doi.org/10.1128/AEM.02474-06>.
- Shanks, O.C., Green, H.C., Korajkic, A., Field, K.G., 2016. Overview of microbial source tracking methods targeting human fecal pollution sources. *Manual of Environmental Microbiology*, Fourth Edition.
- Shanks, O.C., Santo Domingo, J.W., Lamendella, R., Kelty, C.A., Graham, J.E., 2006. Competitive metagenomic DNA hybridization identifies host-specific microbial genetic markers in cow fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (6), 4054–4060, <https://doi.org/10.1128/AEM.00023-06>.

- Shanks, O.C., White, K., Kelty, C.A., Sivaganesan, M., Blannon, J., Meckes, M., Varma, M., Haugland, R.A., 2010. Performance of PCR-based assays targeting *Bacteroidales* genetic markers of human fecal pollution in sewage and fecal samples. *Environ. Sci. Technol.* 44 (16), 6281–6288, <https://doi.org/10.1021/es100311n>.
- Sheffield, V.C., Cox, D.R., Lerman, L.S., Myers, R.M., 1989. Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 86 (1), 232–236, <https://doi.org/10.1073/pnas.86.1.232>.
- Shelton, D.R., Karns, J.S., Higgins, J.A., Van Kessel, Jo Ann S, Perdue, M.L., Belt, K.T., Russell-Anelli, J., Debroy, C., 2006. Impact of microbial diversity on rapid detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in surface waters. *FEMS Microbiol. Lett.* 261 (1), 95–101, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00334.x>.
- Shendure, J., Ji, H., 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nat. Biotechnol.* 26 (10), 1135–1145, <https://doi.org/10.1038/nbt1486>.
- Sidhu, J.P.S., Ahmed, W., Hodggers, L., Toze, S., 2013. Occurrence of virulence genes associated with diarrheagenic pathotypes in *Escherichia coli* isolates from surface water. *Appl. Environ. Microbiol.* 79 (1), 328–335, <https://doi.org/10.1128/AEM.02888-12>.
- Siefring, S., Varma, M., Atikovic, E., Wymer, L., Haugland, R.A., 2008. Improved real-time PCR assays for the detection of fecal indicator bacteria in surface waters with different instrument and reagent systems. *J. Water Health* 6 (2), 225–237, <https://doi.org/10.2166/wh.2008.022>.
- Sievers, R.E., Barkley, R.M., Eiceman, G.A., Shapiro, R.H., Walton, H.F., Kolonko, K.J., Field, L.R., 1977. Environmental trace analysis of organics in water by glass capillary column chromatography and ancillary techniques. *J Chromatogr A* 142, 745–754, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)92082-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)92082-5).
- Silkie, S.S., Nelson, K.L., 2009. Concentrations of host-specific and generic fecal markers measured by quantitative PCR in raw sewage and fresh animal feces. *Water Res.* 43 (19), 4860–4871, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.08.017>.
- Simpson, J.M., Santo Domingo, J.W., Reasoner, D.J., 2002. Microbial source tracking: State of the science. *Environ. Sci. Technol.* 36 (24), 5279–5288, <https://doi.org/10.1021/es026000b>.
- Simpson, J.M., Santo Domingo, J.W., Reasoner, D.J., 2004. Assessment of equine fecal contamination: The search for alternative bacterial source-tracking targets. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47 (1), 65–75, [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00250-2](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00250-2).
- Skanavis, C., Yanko, W.A., 2001. *Clostridium perfringens* as a potential indicator for the presence of sewage solids in marine sediments. *Mar. Pollut. Bull.* 42 (1), 31–35, [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(00\)00087-4](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(00)00087-4).
- Sköld, O., 2000. Sulfonamide resistance: Mechanisms and trends. *Drug Resist. Updat.* 3 (3), 155–160, <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0146>.
- Somarelli, J.A., Makarewicz, J.C., Sia, R., Simon, R., 2007. Wildlife identified as major source of *Escherichia coli* in agriculturally dominated watersheds by BOX A1R-derived genetic fingerprints. *J. Environ. Manage.* 82 (1), 60–65, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2005.12.013>.
- Sorensen, D.L., Eberl, S.G., Dicksa, R.A., 1989. *Clostridium perfringens* as a point source indicator in non-point polluted streams. *Water Res.* 23 (2), 191–197, [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(89\)90043-2](https://doi.org/10.1016/0043-1354(89)90043-2).
- Stachler, E., Bibby, K., 2014. Metagenomic evaluation of the highly abundant human gut bacteriophage crAssphage for source tracking of human fecal pollution. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 1 (10), 405–409, <https://doi.org/10.1021/ez500266s>.
- Stachler, E., Crank, K., Bibby, K., 2019. Co-occurrence of crAssphage with antibiotic resistance genes in an impacted urban watershed. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 6 (4), 216–221, <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.9b00130>.
- Stachler, E., Kelty, C., Sivaganesan, M., Li, X., Bibby, K., Shanks, O.C., 2017. Quantitative crAssphage PCR assays for human fecal pollution measurement. *Environ. Sci. Technol.* 51 (16), 9146–9154, <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02703>.
- Stalder, T., Barraud, O., Jové, T., Casellas, M., Gaschet, M., Dagot, C., Ploy, M.-C., 2014. Quantitative and qualitative impact of hospital effluent on dissemination of the integron pool. *ISME J.* 8 (4), 768–777, <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.189>.
- Staley, Z.R., Edge, T.A., 2016. Comparative microbial source tracking methods for identification of fecal contamination sources at Sunnyside Beach in the Toronto region area of concern. *J. Water Health* 14 (5), 839–850, <https://doi.org/10.2166/wh.2016.296>.
- Stange, C., Sidhu, J. P. S., Tiehm, A., Toze, S., 2016. Antibiotic resistance and virulence genes in coliform water isolates. *Int J Hyg Environ Health* 219 (8), 823–831, <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.07.015>.

- Stern, M.J., Ames, G.F.-L., Smith, N.H., Clare Robinson, E., Higgins, C.F., 1984. Repetitive extragenic palindromic sequences: A major component of the bacterial genome. *Cell* 37 (3), 1015–1026, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90436-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90436-7).
- Stoeckel, D.M., Harwood, V.J., 2007. Performance, design, and analysis in microbial source tracking studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (8), 2405–2415, <https://doi.org/10.1128/AEM.02473-06>.
- Stoll, C., Sidhu, J. P. S., Tiehm, A., Toze, S., 2012. Prevalence of clinically relevant antibiotic resistance genes in surface water samples collected from Germany and Australia. *Environ. Sci. Technol.* 46 (17), 9716–9726, <https://doi.org/10.1021/es302020s>.
- Strayle, G., 1970. Karsthydrologische Untersuchungen auf der Ebinger Alb (Schwäbisches Jura). *Jahresheft des geologischen Landesamtes Baden-Württemberg* 12, 109–209.
- Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J.J., Gibson, G.R., Collins, M.D., Dore, J., 1999. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (11), 4799–4807, <https://doi.org/10.1128/AEM.65.11.4799-4807.1999>.
- Sun, P., Bi, Z., Nilsson, M., Zheng, B., Berglund, B., Stålsby Lundborg, C., Börjesson, S., Li, X., Chen, B., Yin, H., Nilsson, L.E., 2017. Occurrence of *bla*_{KPC-2}, *bla*_{CTX-M}, and *mcr-1* in *Enterobacteriaceae* from well water in rural China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61 (4), <https://doi.org/10.1128/AAC.02569-16>.
- Swaminathan, B., Barrett, T.J., Hunter, S.B., Tauxe, R.V., 2001. PulseNet: The molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 7 (3), 382–389, <https://doi.org/10.3201/eid0703.010303>.
- Symonds, E.M., Salazar, E. R., Jimenez, J. A., Harwood, V.J., Breitbart, M., 2016. Conjunto de herramientas para el rastreo de fuentes de contaminación microbiana para la identificación de contaminación fecal en la costa del Pacífico de Costa Rica (A microbial source tracking toolbox for the identification of fecal pollution for the Pacific Coast of Costa Rica).
- Szekeres, E., Chiriac, C.M., Baricz, A., Szőke-Nagy, T., Lung, I., Soran, M.-L., Rudi, K., Dragos, N., Coman, C., 2018. Investigating antibiotics, antibiotic resistance genes, and microbial contaminants in groundwater in relation to the proximity of urban areas. *Environ Pollut* 236, 734–744, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.107>.
- Tacão, M., Moura, A., Correia, A., Henriques, I., 2014. Co-resistance to different classes of antibiotics among ESBL-producers from aquatic systems. *Water Res.* 48, 100–107, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.09.021>.
- Taihu Basin Authority (Ed.), 2016. Taihu basin and southeast rivers water resources bulletin. Taihu basin authority of Ministry of Water Resources of the People's Republic of China, Shanghai.
- Ternes, T., 2007. The occurrence of micropollutants in the aquatic environment: A new challenge for water management. *Water Sci. Technol.* 55 (12), 327–332, <https://doi.org/10.2166/wst.2007.428>.
- Tezak, K.D., 2009. Identification of a dog-specific *Bacteroides* 16S rRNA genetic marker for the quantification of nonpoint source fecal pollution. Master Thesis.
- Thurston-Enriquez, J.A., Haas, C.N., Jacangelo, J., Gerba, C.P., 2003a. Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (7), 3979–3985, <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.3979-3985.2003>.
- Thurston-Enriquez, J.A., Haas, C.N., Jacangelo, J., Riley, K., Gerba, C.P., 2003b. Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (1), 577–582, <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.577-582.2003>.
- Ting, W.T., Johnson, D., Holler, A., Tran, K., Tseng, C., 2003. A study of the sources of *E. coli* contamination at Marquette Park Beach by random amplified polymorphic DNA typing. Abstracts of the 103rd Annual Meeting of the American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Tranter, M., Schipperski, F., Zirlwagen, J., Scheytt, T., 2017. Hydraulic linkage of a storm water tank to a karst spring (Gallusquelle). *Groundwater* 22 (1), 55–62, <https://doi.org/10.1007/s00767-016-0346-8>.
- Trinkwasserverordnung (TrinkwV), 2001. Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch. Trinkwasserverordnung (TrinkwV). Fassung der Bekanntmachung vom 10. März 2016 (BGBl. I S.459), zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 3. Januar 2018 (BGBl. I S. 99) geändert.
- Tsai, Y.-L., Le, J.Y., Olson, B.H., 2003. Magnetic bead hybridization to detect enterotoxigenic *Escherichia coli* strains associated with cattle in environmental water sources. *Can. J. Microbiol.* 49 (6), 391–398, <https://doi.org/10.1139/w03-048>.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., Gordon, J.I., 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444 (7122), 1027–1031, <https://doi.org/10.1038/nature05414>.

- Ufnar, J.A., Ufnar, D.F., Wang, S.Y., Ellender, R.D., 2007a. Development of a swine-specific fecal pollution marker based on host differences in methanogen *mcrA* genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (16), 5209–5217, <https://doi.org/10.1128/AEM.00319-07>.
- Ufnar, J.A., Wang, S.Y., Christiansen, J.M., Yampara-Iquise, H., Carson, C.A., Ellender, R.D., 2006. Detection of the *nifH* gene of *Methanobrevibacter smithii*: A potential tool to identify sewage pollution in recreational waters. *J. Appl. Microbiol.* 101 (1), 44–52, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02989.x>.
- Ufnar, J.A., Wang, S.Y., Ufnar, D.F., Ellender, R.D., 2007b. *Methanobrevibacter ruminantium* as an indicator of domesticated-ruminant fecal pollution in surface waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (21), 7118–7121, <https://doi.org/10.1128/AEM.00911-07>.
- Umweltbundesamt (UBA), 2018. Antibiotikaresistenzen in der Umwelt - Hintergrund, Herausforderungen und Handlungsoptionen. https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/479/publikationen/181012_uba_hg_antibiotika_bf.pdf.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 1995. USEPA Manual of methods for virology No. EPA 600/4-84/013 (N15). USEPA, Office of Research and Development, Cincinnati. https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_report.cfm?Lab=NERL&dirEntryId=64147&simpleSearch=1&searchAll=EPA+600-4-84-013.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2005. Microbial source tracking guide document. USEPA, Office of Research and Development, Cincinnati. <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/2000D20V.PDF?Dockey=2000D20V.PDF>.
- Unno, T., Di, D.Y.W., Jang, J., Suh, Y.S., Sadowsky, M.J., Hur, H.-G., 2012. Integrated online system for a pyrosequencing-based microbial source tracking method that targets *Bacteroidetes* 16S rDNA. *Environ. Sci. Technol.* 46 (1), 93–98, <https://doi.org/10.1021/es201380c>.
- Vadde, K.K., McCarthy, A.J., Rong, R., Sekar, R., 2019. Quantification of microbial source tracking and pathogenic bacterial markers in water and sediments of Tiaoxi River (Taihu watershed). *Front. Microbiol.* 10, 4379, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00699>.
- van Belkum, A., Struelens, M., Visser, A. de, Verbrugh, H., Tibayrenc, M., 2001. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 14 (3), 547–560, <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.547-560.2001>.
- van Heerden, J., Ehlers, M.M., van Zyl, W.B., Grabow, W.O., 2003. Incidence of adenoviruses in raw and treated water. *Water Res.* 37 (15), 3704–3708, [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00245-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00245-8).
- Vengosh, A., Heuman, K.G., Juraske, S., Kashner, R., 1994. Boron isotope application for tracing sources of contamination in groundwater. *Environ. Sci. Technol.* 11 (28), 1968–1974.
- Venieri, D., Vantarakis, G., Komninou, G., Papapetropoulou, M., 2004. Differentiation of fecal *Escherichia coli* from human and animal sources by random amplified polymorphic DNA-PCR. *Water Sci. Technol.* 50 (1), 193–198.
- Verplanck, P.L., Taylor, H.E., Nordstro, D.K., Barber, L.B., 2005. Aqueous stability of gadolinium in surface waters receiving sewage treatment plant effluent, boulder creek, Colorado. *Environ. Sci. Technol.* (39), 6923–6929.
- Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R., 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucl. Acids Res.* 19 (24), 6823–6831, <https://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23 (21), 4407–4414, <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>.
- Wallis, J.L., Taylor, H.D., 2003. Phenotypic population characteristics of the enterococci in wastewater and animal faeces: Implications for the new European directive on the quality of bathing waters. *Water Sci. Technol.* 47 (3), 27–32.
- Walsh, T.R., Weeks, J., Livermore, D.M., Toleman, M.A., 2011. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: An environmental point prevalence study. *Lancet Infect. Dis.* 11 (5), 355–362, [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70059-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70059-7).
- Walters, S.P., Field, K.G., 2009. Survival and persistence of human and ruminant-specific faecal *Bacteroidales* in freshwater microcosms. *Environ. Microbiol.* 11 (6), 1410–1421, <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01868.x>.
- Wang, D., Silkie, S.S., Nelson, K.L., Wuertz, S., 2010. Estimating true human and animal host source contribution in quantitative microbial source tracking using the Monte Carlo method. *Water Res.* 44 (16), 4760–4775, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.076>.

- Wang, J.W., Pu, H., Ye, L., Chen, L., Zhang, X., 2016. Occurrence of antibiotic resistance and integronase genes in Taihu Lake.
- Wang, R., van Dorp, L., Shaw, L.P., Bradley, P., Wang, Q., Wang, X., Jin, L., Zhang, Q., Liu, Y., Rieux, A., Dorai-Schneiders, T., Weinert, L.A., Iqbal, Z., Didelot, X., Wang, H., Balloux, F., 2018. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*. *Nat. Commun.* 9 (1), 1179, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03205-z>.
- Ward, J.W., Reed, T.M., Fryar, A.F., Brion, G.M., 2009. Using the AC/TC ratio to evaluate fecal inputs in a karst groundwater basin. *Environ. Engine. Geosci.* 15 (2), 57–65, <https://doi.org/10.2113/gsegeosci.15.2.57>.
- Warner, W., Licha, T., Nödler, K., 2019. Qualitative and quantitative use of micropollutants as source and process indicators. A review. *Sci. Total Environ.* 686, 75–89, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.385>.
- Weidhaas, J.L., Macbeth, T.W., Olsen, R.L., Sadowsky, M.J., Norat, D., Harwood, V.J., 2010. Identification of a *Brevibacterium* marker gene specific to poultry litter and development of a quantitative PCR assay. *J. Appl. Microbiol.* 109 (1), 334–347, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04666.x>.
- Welsh, J., McClelland, M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* 18 (24), 7213–7218, <https://doi.org/10.1093/nar/18.24.7213>.
- Wheeler, A.L., Hartel, P.G., Godfrey, D.G., Hill, J.L., Segars, W.I., 2002. Potential of *Enterococcus faecalis* as a human fecal indicator for microbial source tracking. *J. Environ. Qual.* 31 (4), 1286–1293, <https://doi.org/10.2134/jeq2002.1286>.
- White, M.K., Gordon, J., Reiss, K., Del Valle, L., Croul, S., Giordano, A., Darbinyan, A., Khalili, K., 2005. Human polyomaviruses and brain tumors. *Brain Res. Rev.* 50 (1), 69–85, <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2005.04.007>.
- Whitman, R.L., Przybyla-Kelly, K., Shively, D.A., Byappanahalli, M.N., 2007. Incidence of the enterococcal surface protein (*esp*) gene in human and animal fecal sources. *Environ. Sci. Technol.* 41 (17), 6090–6095, <https://doi.org/10.1021/es070817t>.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J., 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95 (12), 6578–6583, <https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.6578>.
- Wicki, M., Auckenthaler, A., Felleisen, R., Tanner, M., Baumgartner, A., 2011. Novel *Bacteroides* host strains for detection of human- and animal-specific bacteriophages in water. *J. Water Health* 9 (1), 159–168, <https://doi.org/10.2166/wh.2010.165>.
- Wiggins, B.A., 1996. Discriminant analysis of antibiotic resistance patterns in fecal streptococci, a method to differentiate human and animal sources of fecal pollution in natural waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (11), 3997–4002, <https://doi.org/10.1128/aem.62.11.3997-4002.1996>.
- Wiggins, B.A., Cash, P.W., Creamer, W.S., Dart, S.E., Garcia, P.P., Gerecke, T.M., Han, J., Henry, B.L., Hoover, K.B., Johnson, E.L., Jones, K.C., McCarthy, J.G., McDonough, J.A., Mercer, S.A., Noto, M.J., Park, H., Phillips, M.S., Purner, S.M., Smith, B.M., Stevens, E.N., Varner, A.K., 2003. Use of antibiotic resistance analysis for representativeness testing of multiwatershed libraries. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (6), 3399–3405, <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3399-3405.2003>.
- Wilhartitz, I., Mach, R.L., Teira, E., Reinthaler, T., Herndl, G.J., Farnleitner, A.H., 2007. Prokaryotic community analysis with CARD-FISH in comparison with FISH in ultra-oligotrophic ground- and drinking water. *J. Appl. Microbiol.* 103 (4), 871–881, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03319.x>.
- Wilhelm, S.W., Farnsley, S.E., Leclerc, G.R., Layton, A.C., Satchwell, M.F., DeBruyn, J.M., Boyer, G.L., Zhu, G., Paerl, H.W., 2011. The relationships between nutrients, cyanobacterial toxins and the microbial community in Taihu (Lake Tai), China. *Harmful Algae* 10 (2), 207–215, <https://doi.org/10.1016/j.hal.2010.10.001>.
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18 (22), 6531–6535, <https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6531>.
- Winfield, M.D., Groisman, E.A., 2003. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (7), 3687–3694, <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.3687-3694.2003>.
- Wittmer, I.K., Scheidegger, R., Bader, H.-P., Singer, H., Stamm, C., 2011. Loss rates of urban biocides can exceed those of agricultural pesticides. *Sci. Total Environ.* 409 (5), 920–932, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.11.031>.
- Wolf, L., Zwiener, C., Zemann, M., 2012. Tracking artificial sweeteners and pharmaceuticals introduced into urban groundwater by leaking sewer networks. *Sci. Total Environ.* 430, 8–19, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.059>.

- Wolf, S., Hewitt, J., Greening, G.E., 2010. Viral multiplex quantitative PCR assays for tracking sources of fecal contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (5), 1388–1394, <https://doi.org/10.1128/AEM.02249-09>.
- Wong, K., Fong, T.-T., Bibby, K., Molina, M., 2012. Application of enteric viruses for fecal pollution source tracking in environmental waters. *Environ. Int.* 45, 151–164, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.02.009>.
- Wong, K., Xagorarakis, I., 2010. Quantitative PCR assays to survey the bovine adenovirus levels in environmental samples. *J. Appl. Microbiol.* 109 (2), 605–612, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04684.x>.
- Wong, K., Xagorarakis, I., 2011. Evaluating the prevalence and genetic diversity of adenovirus and polyomavirus in bovine waste for microbial source tracking. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90 (4), 1521–1526, <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3156-z>.
- World Health Organisation (WHO), 2011. Guidelines for drinking water quality. http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44584/9789241548151_eng.pdf?sequence=1.
- World Health Organisation (WHO), 2014. Antimicrobial resistance - global report on surveillance. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y, 256 pp.
- Xiong, W., Sun, Y., Ding, X., Zhang, Y., Zeng, Z., 2014. Antibiotic resistance genes occurrence and bacterial community composition in the Liuxi River. *Front. Environ. Sci.* 2, 251, <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00061>.
- Xiong, W., Sun, Y., Zhang, T., Ding, X., Li, Y., Wang, M., Zeng, Z., 2015. Antibiotics, antibiotic resistance genes, and bacterial community composition in fresh water aquaculture environment in China. *Microb. Ecol.* 70 (2), 425–432, <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0583-x>.
- Xu, J., Bjursell, M.K., Himrod, J., Deng, S., Carmichael, L.K., Chiang, H.C., Hooper, L.V., Gordon, J.I., 2003. A genomic view of the human-*Bacteroides thetaiotaomicron* symbiosis. *Science* 299 (5615), 2074–2076, <https://doi.org/10.1126/science.1080029>.
- Yampara-Iquise, H., Zheng, G., Jones, J.E., Carson, C.A., 2008. Use of a *Bacteroides thetaiotaomicron*-specific alpha-1-6, mannanase quantitative PCR to detect human faecal pollution in water. *J. Appl. Microbiol.* 105 (5), 1686–1693, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03895.x>.
- Yang, D., Qiu, Z., Shen, Z., Zhao, H., Jin, M., Li, H., Liu, W., Li, J.-W., 2017a. The occurrence of the colistin resistance gene *mcr-1* in the Haihe River (China). *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14 (6), <https://doi.org/10.3390/ijerph14060576>.
- Yang, J., Holbach, A., Wilhelms, A., Qin, Y., Zheng, B., Zou, H., Qin, B., Zhu, G., Norra, S., 2019. Highly time-resolved analysis of seasonal water dynamics and algal kinetics based on in-situ multi-sensor-system monitoring data in Lake Taihu, China. *Sci. Total Environ.* 660, 329–339, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.044>.
- Yang, Y., Griffiths, M.W., 2013. Comparative persistence of subgroups of F-specific RNA phages in river water. *Appl. Environ. Microbiol.* 79 (15), 4564–4567, <https://doi.org/10.1128/AEM.00612-13>.
- Yang, Y., Liu, W., Xu, C., Wei, B., Wang, J., 2017b. Antibiotic resistance genes in lakes from middle and lower reaches of the Yangtze River, China: Effect of land use and sediment characteristics. *Chemosphere* 178, 19–25, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.041>.
- Yang, Y., Xu, C., Cao, X., Lin, H., Wang, J., 2017c. Antibiotic resistance genes in surface water of eutrophic urban lakes are related to heavy metals, antibiotics, lake morphology and anthropic impact. *Ecotoxicol.* 26 (6), 831–840, <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1814-3>.
- Yang, Y.-Y., Zhao, J.-L., Liu, Y.-S., Liu, W.-R., Zhang, Q.-Q., Yao, L., Hu, L.-X., Zhang, J.-N., Jiang, Y.-X., Ying, G.-G., 2018. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and artificial sweeteners (ASs) in surface and ground waters and their application as indication of wastewater contamination. *Sci. Total Environ.* 616–617, 816–823, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.241>.
- Yin, Q., Yue, D., Peng, Y., Liu, Y., Xiao, L., 2013. Occurrence and distribution of antibiotic-resistant bacteria and transfer of resistance genes in Lake Taihu. *Microbes Environ.* 28 (4), 479–486, <https://doi.org/10.1264/jsme2.me13098>.
- Ying, G.-G., He, L.-Y., Ying, A.J., Zhang, Q.-Q., Liu, Y.-S., Zhao, J.-L., 2017. China must reduce its antibiotic use. *Environ. Sci. Technol.* 51 (3), 1072–1073, <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b06424>.
- Yoder, J., Roberts, V., Craun, G.F., Hill, V., Hicks, L., Alexander N. T., et al., 2008. Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with drinking water and water not intended for drinking water - United States, 2005–2006. *MMWR CDC Surveill. Summ.* 57 (9), 39–69.
- Yong, D., Toleman, M.A., Giske, C.G., Cho, H.S., Sundman, K., Lee, K., Walsh, T.R., 2009. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53 (12), 5046–5054, <https://doi.org/10.1128/AAC.00774-09>.

- Yurtsever, D., Haznedaroglu, B.Z., Dunaev, T., Duran, M., 2007. The effects of indicator organism type on phenotypic characterization of host-specificity and the implications for microbial source tracking. *Proc. Water Environ. Fed.* 2007 (11), 7063–7071, <https://doi.org/10.2175/193864707787223556>.
- Zelles, L., 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: A review. *Biol. Fertil. Soils* 29 (2), 111–129, <https://doi.org/10.1007/s003740050533>.
- Zhang, K., Niu, Z.-G., Lv, Z., Zhang, Y., 2017. Occurrence and distribution of antibiotic resistance genes in water supply reservoirs in Jingjinji area, China. *Ecotoxicol.* 26 (9), 1284–1292, <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1853-9>.
- Zhang, Q.-Q., Ying, G.-G., Pan, C.-G., Liu, Y.-S., Zhao, J.-L., 2015. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: Source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance. *Environ. Sci. Technol.* 49 (11), 6772–6782, <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00729>.
- Zhang, R., Qian, X., Yuan, X., Ye, R., Xia, B., Wang, Y., 2012. Simulation of water environmental capacity and pollution load reduction using QUAL2K for water environmental management. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 9 (12), 4504–4521, <https://doi.org/10.3390/ijerph9124504>.
- Zhang, X., Wu, B., Zhang, Y., Zhang, T., Yang L., Fang, H.H., Ford, T., Cheng, S., 2009a. Class 1 integronase gene and tetracycline resistance genes *tetA* and *tetC* in different water environments of Jiangsu Province, China. *Ecotoxicol.* 18 (6), 652–660, <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0332-3>.
- Zhang, X.-X., Zhang, T., Fang, H.H.P., 2009b. Antibiotic resistance genes in water environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82 (3), 397–414, <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1829-z>.
- Zhang, Y., Kelly, W.R., Panno, S.V., Liu, W.-T., 2014. Tracing fecal pollution sources in karst groundwater by *Bacteroidales* genetic biomarkers, bacterial indicators, and environmental variables. *Sci. Total Environ.* 490, 1082–1090, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.086>.
- Zheng, G., Yampara-Iquise, H., Jones, J.E., Andrew Carson, C., 2009. Development of *Faecalibacterium* 16S rRNA gene marker for identification of human faeces. *J. Appl. Microbiol.* 106 (2), 634–641, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04037.x>.
- Zhong, S., Zheng, H.-Y., Suzuki, M., Chen, Q., Ikegaya, H., Aoki, N., Usuku, S., Kobayashi, N., Nukuzuma, S., Yasuda, Y., Kuniyoshi, N., Yogo, Y., Kitamura, T., 2007. Age-related urinary excretion of BK polyomavirus by nonimmunocompromised individuals. *J. Clin. Microbiol.* 45 (1), 193–198, <https://doi.org/10.1128/JCM.01645-06>.
- Zhou, T., Lu, J., Tong, Y., Li, S., Wang, X., 2014. Distribution of antibiotic resistance genes in Bosten Lake, Xinjiang, China. *Water Sci. Technol.* 70 (5), 925–931, <https://doi.org/10.2166/wst.2014.321>.
- Zirlewagen, J., Licha, T., Schiperski, F., Nödler, K., Scheytt, T., 2016. Use of two artificial sweeteners, cyclamate and acesulfame, to identify and quantify wastewater contributions in a karst spring. *Sci. Total Environ.* 547, 356–365, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.112>.
- Zurfluh, K., Poirel, L., Nordmann, P., Nüesch-Inderbinnen, M., Hächler, H., Stephan, R., 2016. Occurrence of the plasmid-borne *mcr-1* colistin resistance gene in extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in river water and imported vegetable samples in Switzerland. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60 (4), 2594–2595, <https://doi.org/10.1128/AAC.00066-16>.

10. ANHANG

10.1 Liste der Geräte und Materialien

Im Nachfolgenden sind die wichtigsten Geräte, Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Medien aufgeführt. Die Aufstellungen erheben keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

10.1.1 Geräte

Tabelle 10.1: Auflistung der verwendeten Geräte.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Agarosegelsystem	EasyPhor Maxi und Medi	Biozym
Anaerobbox	Custom Chamber	Coy.
Aquarienpumpe	Alize	RENA
Autoklav	3850EL	Tuttnauer
Autoklav	Laboklav 55-195	SHP Steriltechnik
DGGE-System	VS20WAVE-DGGE	Cleaver Scientific
DOC-Gerät	Vario TOC Cube	Elementar Analysensysteme
Filterapparatur	Nutsche SM16201 mit Saugflasche	Sartorius
Filtrationsleiste	EZ-Fit™ Basisleiste	Millipore
Fluorometer	Qubit	Life Technologies
Homogenisator	FastPrep-24	MP Biomedicals
Inkubator	IN260, IPP260, INE500, BE500	Memmert
Kapillarelektrophorese	QIAxcel Advanced System	Qiagen
Magnetrührer	MAG REO, KMO2 electronic	IKA Labortechnik
PCR-Bank	DNA/RNA UV-cleaner box	BioSan
PCR-Cycler	Tpersonal	Biometra
Photometer	NanoPhotometer Classic 1120	Implen
pH-Sonde	SenTix 41 Sonde	WTW
Real-time PCR-Cycler	Realplex	Eppendorf
Real-time PCR-Cycler	Rotor-Gene 6000	Corbett Life Science
Real-time PCR-Cycler	Rotor-Gene Q	Qiagen
Real-time PCR-Cycler	iQ-5	BioRad
Redoxpotenzial-Sonde	Sensolyt Platinelektrode	WTW
Sauerstoff-Sonde	OxiCal-S	WTW
Sauerstoff-Sonde	CellOx 325 Elektrode	WTW
Schüttelinkubator	KS15A / TH15	Edmund-Bühler GmbH
Spannungserzeuger	E122	Consort
Sterilbank	TecnoFlow 3F120-II-GS	Integra Bioscience
Thermoblock mit Schüttelfunktion	MB-102	Bioer Technology
UV-Auszahlgerät	UV Viewing Cabinet	IDEXX
Versiegelungsgerät	Quanti-Tray Sealer	IDEXX
Vortex	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waage	L 610-D	Sartorius AG
Wasserbad	WNB	Memmert
Zentrifuge	Heraeus Multifuge X1R	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge	Heraeus Fresco21	Thermo Fisher Scientific

10.1.2 Kits, Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 10.2: Auflistung der verwendeten Kits, Reagenzien und Chemikalien.

Einsatzbereich	Bezeichnung	Hersteller
Herstellung DNA-Standards	Ampicillin	Carl Roth
	Apa I Restriktionsendonuklease	Roche Diagnostics
	<i>E. coli</i> K12 JM109	Promega
	High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Diagnostics
	IPTG	Carl Roth
	pGEM®-T Vector System	Promega
	Qiagen® Plasmid Midi Kit	Qiagen
	QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen
	Qubit™ ds DNA BR Assay Kit	Life Technology
	x-Gal	Carl Roth
DNA-Extraktion	2-Propanol	Carl Roth
	Bacterial Xpress	Merck Millipore
	DNAeasy blood and tissue Kit	Qiagen
	Ethanol	Merck
	FastDNA™ Spin Kit for Soil	MP Biomedicals
PCR	dNTPs	Carl Roth
	Molzym Polymerase	Carl Roth
	Nukleasefreies Ultrareines Wasser (UltraPure™)	Invitrogen
	SensiMix SYBR No-ROX Kit	Bioline
	Sso Fast™ EvaGreen® Supermix	BioRad
Gelelektrophorese	Acrylamid-Bis-Fertiglösung 40%	Merck
	Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth
	EDTA-Na2-Salz	Carl Roth
	Essigsäure, 100 %	Merck
	Ethidiumbromid-Lösung 1%	Carl Roth
	pBR328-Marker (ready-to-use)	Carl Roth
	QIAxcel DNA Screening Kit	Qiagen
	QX DNA Alignment Marker 15 bp/3 kb	Qiagen
	Roti®-Load DNA Gelladepuffer	Carl Roth
	SYBR® Gold	Life Technologies
Kulturverfahren	TRIS	Carl Roth
	1-Naphthylphosphat-Dinatriumsalz	Sigma-Aldrich
	Acetatpufferlösung pH 4,6 ± 0,2 (20 °C)	Carl Roth
	Agar-Agar	Carl Roth
	API 20E Teststreifen	BioMerieux
	Colilert-18	IDEXX
	D(+)Glucose	Merck
	Echtblausalz B (Fast Blue B Salt)	Sigma-Aldrich
	Enterolert	IDEXX
	Hefeextrakt	Merck
	Kaliumchlorid (KCl)	Merck
	Magnesiumchlorid (MgCl)	Merck
	Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth
	Pepton (M66 Universal)	Merck
	Trypton	Oxoid

10.1.3 Verbrauchsmaterial

Tabelle 10.3: Auflistung der Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller
Anaerogenbeutel, AnaeroGen™ 3,5 L	Oxoid
Autoklavierband Comply™	VWR
Autoklavierbeutel, 10 L	Carl Roth
Autoklavierbeutel, 30 L	Carl Roth
BelüftungsfILTER Acro 37 TF, 0,2 µm PTFE-Membran	Pall
Cryoröhrchen	Mast Diagnostica
Einmal-Impfösen	VWR
Filterspitzen 0,5-10 µL	VWR
Filterspitzen 100-1000 µL	VWR
Filterspitzen 10-100 µL	Brand bzw. VWR
Filtrationstrichter Microfil®, 100 mL	Merck Millipore
Gefäße 120 mL, Anti-Foam	IDEXX
Lyse-Matrix E, 2 mL	MP Biomedicals
Membranfilter EZ-Pak®, 0,45 µm	Merck Millipore
Membranfilter Supor®-200 0,2 µm 47 mm	Pall
Nitrilhandschuhe	Carl Roth
PCR-Gefäße, 0,1 mL TW 4er Tube / Cap-Strip	Biozym
PCR-Gefäße, 0,1 mL	Biozym
PCR-Gefäße, 0,2 mL, 12er-Streifen	Biozym
PCR-Gefäße, 0,2 mL, 8er-Streifen	Biozym
Petrischalen 60 x 15 mm	Greiner Bio-One
Petrischalen 94 x 16 mm	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen, 0,5 µL-10 µL	Brand bzw. VWR
Pipettenspitzen, 10 µL-100 µL	VWR
Pipettenspitzen, 100 µL-1000 µL	Brand
Plastikflaschen, steril (1 L)	VWR
QuantiTray 2000	IDEXX
Reaktionsgefäße 2 mL mit Schraubdeckel	VWR
Reaktionsgefäße 3810X, 1,5 mL	Eppendorf
Reaktionsgefäße, 5 mL	Biozym
Reaktionsgefäße, QX coloured 0,2 mL, 12er Streifen	Brand
Resazurin-Anaerob-Indikator	Oxoid
Zentrifugenröhrchen, 15 mL, PP, mit Schraubdeckel, ohne Standring, steril	VWR
Zentrifugenröhrchen, 50 mL, PP, mit Schraubdeckel, ohne Standring, steril	Brand

10.1.4 Medien und Lösungen

Tabelle 10.4: Herstellung von LAXI-Medium.

Stoff	Menge
NaCl	10 g
Hefeextrakt	5 g
Trypton	10 g
Auf 1L auffüllen, pH auf 7 einstellen, autoklavieren und nach dem Abkühlen auf 50 °C folgende Stoffe zugeben:	
Ampicillin 100 mg/L	1 mL
0,1 M IPTG	5 mL
X-gal 160 mg/L	500 µL

Tabelle 10.5: Herstellung von SOC-Medium.

Stoff	Menge
NaCl	0,6 g
Hefeextrakt	5 g
Trypton	20 g
KCl	0,2 g
Auf 1L auffüllen, pH auf 7 einstellen, autoklavieren und nach dem Abkühlen auf 50 °C folgende sterilfiltrierten Lösungen zugeben:	
MgCl 2M	10 mL
Glukose 2M	10 mL

Tabelle 10.6: Verwendete Trockennährmedien.

Bezeichnung	Hersteller
Mineralien-modifizierter Glutamat-Agar	Merck
Slanetz- und Bartley-Agar	Oxoid
DEV-Agar	Merck
Lactose-TTC-Agar	Merck
Galle-Äsculin-Azid-Agar	Merck
Tryptose-Sulfit-Cycloserin-Agar	Merck
Chromocult Trypton-Galle-X-Glucoronid-Agar	Merck

Diese Nährmedien wurden gemäß den Herstellerangaben angesetzt.

Tabelle 10.7: Herstellung von Pepton-Saline-Lösung (PBS).

Bezeichnung	Menge
Pepton (M66 Universal)	1,0 g
NaCl	8,5 g
Destilliertes Wasser	1000 mL

Tabelle 10.8: Herstellung es Azid-Phosphatase-Reagenz.

Bezeichnung	Menge
1-Naphthylphosphat-Dinatriumsalz	0,4 g
Echtblausalz B (Fast Blue B Salt)	0,8 g
Acetatpufferlösung pH 4,6 ± 0,2 (20 °C)	20 mL

Tabelle 10.9: Herstellung von 50 x TAE-Puffer.

Bezeichnung	Menge
TRIS	242 g
EDTA-Na ₂ -Salz	18,61 g
Essigsäure, 100 %	57,1 mL
Mit destilliertem Wasser auf 1 L auffüllen und mit NaOH und HCl pH 8,3 einstellen	

10.2 Untersuchungsergebnisse

Tabelle 10.10: Untersuchungsergebnisse zur Spezifität und Sensitivität von *Bacteroides*-basierten Markern.

	Wirtsun- spezifisch	Mensch	Wiederkäuer	Hund	Schwein
Mensch A	+	+	+	+	-
Mensch B	+	+	+	+	-
Mensch C	+	+	+	+	-
Mensch D	+	+	+	+	-
Mensch E	+	+	+	-	-
Mensch F	+	+	+	-	-
Mensch G	+	-	-	-	-
Schwein A	+	-	-	-	+
Schwein B	+	-	-	-	+
Schwein C	+	-	-	-	+
Schwein D	+	-	-	-	+
Schwein E	+	-	-	-	+
Schwein F	+	-	-	-	-
Schwein G	+	-	-	-	+
Rind A	+	-	+	-	-
Rind B	+	-	+	-	-
Rind C	+	-	+	-	-
Rind D	+	-	+	-	-
Rind E	+	-	+	-	-
Rind F	+	-	+	-	-
Rind G	+	-	+	-	+
Huhn A	+	-	-	-	-
Huhn B	+	-	+	-	-
Huhn C	+	+	+	-	-
Huhn D	+	+	+	-	-
Huhn E	+	-	-	-	-
Huhn F	+	-	+	-	-
Huhn G	+	-	-	-	-
Pferd A	+	-	-	-	-
Pferd B	+	-	-	-	-
Pferd C	+	-	-	-	-
Pferd D	+	-	-	-	-
Pferd E	+	-	-	-	-
Pferd F	+	-	-	-	+
Hase A	+	+	-	-	-
Hase B	+	-	-	-	-
Reh	+	-	+	-	-
Damwild	+	-	+	-	-
Fuchs	+	-	-	+	-
Wildschwein	+	-	-	-	+
Schaf	+	-	-	-	-
Katze A	+	-	-	-	-
Katze B	+	-	-	+	-
Hund	+	-	-	+	-
Vögel	+	-	-	-	-
Gans	+	-	-	-	-
Kanadagans	+	-	-	-	-
Ente	+	-	-	-	-

Tabelle 10.11: Untersuchungsergebnisse zur Spezifität und Sensitivität von mtDNA-basierten Markern.

	Wirtsun- spezifisch	Mensch	Rind	Huhn	Pferd	Hund	Schaf
Mensch A	+	+	-	-	-	-	-
Mensch B	+	+	-	-	-	-	-
Mensch C	+	+	-	-	-	-	-
Mensch D	+	+	-	-	-	-	-
Mensch E	+	+	-	-	-	-	-
Mensch F	+	+	-	-	-	-	+
Mensch G	+	+	-	-	-	-	-
Schwein A	+	-	-	-	-	-	-
Schwein B	+	-	-	-	-	-	-
Schwein C	+	-	-	-	-	-	-
Schwein D	+	-	-	-	-	-	-
Schwein E	+	-	-	-	-	-	-
Schwein F	+	-	-	-	-	-	-
Schwein G	+	-	-	-	-	-	-
Rind A	+	-	+	-	-	-	-
Rind B	+	-	+	-	-	-	-
Rind C	+	-	+	-	-	-	-
Rind D	+	+	+	-	-	-	-
Rind E	+	-	+	-	-	-	-
Rind F	+	+	+	-	-	-	-
Rind G	+	+	+	-	-	-	-
Huhn A	+	-	-	-	-	-	-
Huhn B	+	-	-	+	-	-	-
Huhn C	+	-	-	+	-	-	-
Huhn D	+	-	-	+	-	-	-
Huhn E	+	-	-	+	-	-	-
Huhn F	+	-	-	+	-	-	-
Huhn G	+	-	-	+	-	-	-
Pferd A	+	-	-	-	+	-	-
Pferd B	+	-	-	-	+	-	-
Pferd C	+	-	-	-	+	-	-
Pferd D	+	-	-	-	+	+	-
Pferd E	+	-	-	-	+	-	-
Pferd F	+	-	-	-	+	-	-
Hase A	+	-	-	-	-	-	-
Hase B	+	-	-	-	-	-	-
Reh	+	-	-	-	-	-	-
Damwild	+	-	-	-	-	-	-
Fuchs	+	-	-	-	-	-	-
Wildschwein	+	-	-	-	-	-	-
Schaf	+	-	-	-	-	-	+
Katze A	+	-	-	-	-	-	-
Katze B	+	-	-	-	-	-	-
Hund	+	-	-	-	-	+	-
Vögel	+	-	-	-	-	-	-
Gans	+	-	-	-	-	-	-
Kanadagans	+	-	-	-	-	+	-
Ente	+	-	-	-	-	-	-

Tabelle 10.12: Darstellung der quantitativen Ergebnisse der Untersuchung der Gallusquelle auf unspezifische und spezifische *Bacteroides* sowie mtDNA-Sequenzen für den Zeitraum Februar-September 2012 (LQ: Limit of Quantification).

Probennahme	<i>Bacteroides</i> -Marker			mtDNA-Marker				
	wirtsun- spezi- fisch	Mensch	Wieder- käufer	Art- unspezi- fisch	Mensch	Rind	Huhn	Pferd
	pro mL							
29.02.2012 08:00	$8,5 \cdot 10^2$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
29.02.2012 11:00	$6,5 \cdot 10^2$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
13.03.2012 09:00	$7,9 \cdot 10^1$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	$4,1 \cdot 10^2$	<LQ
20.03.2012 09:00	$1,8 \cdot 10^2$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	$1,1 \cdot 10^3$	<LQ
27.03.2012 09:00	$9,9 \cdot 10^1$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	$3,7 \cdot 10^2$	<LQ
04.04.2012 09:00	$1,2 \cdot 10^2$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	$6,5 \cdot 10^2$	<LQ
11.04.2012 09:00	$1,3 \cdot 10^2$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	$3,7 \cdot 10^2$	<LQ
19.04.2012 09:00	$2,2 \cdot 10^2$	$5,5 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
02.05.2012 09:00	$1,3 \cdot 10^2$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	$7,1 \cdot 10^2$	<LQ
08.05.2012 09:00	$6,6 \cdot 10^2$	<LQ	<LQ	$8,3 \cdot 10^0$	$4,6 \cdot 10^0$	<LQ	$6,1 \cdot 10^2$	<LQ
14.05.2012 09:00	$1,0 \cdot 10^2$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	$4,1 \cdot 10^2$	<LQ
23.05.2012 09:00	$1,1 \cdot 10^2$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	$1,1 \cdot 10^2$	<LQ
12.06.2012 09:00	$1,6 \cdot 10^2$	$4,5 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	$6,1 \cdot 10^2$	<LQ
19.06.2012 09:00	$7,7 \cdot 10^0$	$7,9 \cdot 10^1$	<LQ	$7,3 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
26.06.2012 09:00	$2,0 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
02.07.2012 11:00	$6,7 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
02.07.2012 18:00	$5,8 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
03.07.2012 09:00	$7,5 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
03.07.2012 10:00	$5,6 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^3$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
03.07.2012 11:00	$9,9 \cdot 10^3$	$2,2 \cdot 10^3$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
03.07.2012 13:00	$1,3 \cdot 10^4$	$3,1 \cdot 10^3$	$4,8 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
03.07.2012 14:00	$2,0 \cdot 10^4$	$5,0 \cdot 10^3$	$7,4 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
03.07.2012 15:00	$1,9 \cdot 10^4$	$5,7 \cdot 10^3$	$1,8 \cdot 10^1$	$5,7 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
04.07.2012 08:00	$1,7 \cdot 10^4$	$4,1 \cdot 10^3$	$9,2 \cdot 10^0$	$5,1 \cdot 10^1$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
04.07.2012 12:00	$7,8 \cdot 10^3$	$1,8 \cdot 10^3$	$4,2 \cdot 10^0$	$1,3 \cdot 10^3$	$8,8 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	<LQ
04.07.2012 20:00	$5,4 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^3$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
05.07.2012 10:00	$2,2 \cdot 10^3$	$4,6 \cdot 10^2$	<LQ	$8,2 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
05.07.2012 11:00	$2,7 \cdot 10^3$	$4,6 \cdot 10^2$	<LQ	$2,0 \cdot 10^2$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
05.07.2012 12:00	$2,2 \cdot 10^3$	$5,2 \cdot 10^2$	<LQ	$3,6 \cdot 10^2$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
05.07.2012 13:00	$1,9 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^2$	<LQ	$1,7 \cdot 10^2$	$5,2 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	<LQ
10.07.2012 09:00	$9,5 \cdot 10^1$	$1,4 \cdot 10^1$	<LQ	$7,8 \cdot 10^1$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
17.07.2012 09:00	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
24.07.2012 09:00	$2,3 \cdot 10^3$	<LQ	<LQ	$4,0 \cdot 10^3$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
01.08.2012 09:00	$8,4 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	$4,3 \cdot 10^0$	$6,0 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	<LQ
07.08.2012 09:00	$1,2 \cdot 10^1$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
21.08.2012 09:00	$1,7 \cdot 10^3$	<LQ	<LQ	$1,5 \cdot 10^3$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
28.08.2012 09:00	<LQ	<LQ	<LQ	$4,9 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
04.09.2012 09:00	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
10.09.2012 09:00	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
18.09.2012 09:00	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
26.09.2012 09:00	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	$6,1 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	<LQ

Ereignis A: Starkregen

		Bacteroides-Marker			mtDNA-Marker				
Probennahme		Wirts- unspezi- fisch	Mensch	Wieder- käufer	Art- unspezi- fisch	Mensch	Rind	Huhn	Pferd
		pro mL							
Ereignis B: unbekannte Ursache	05.10.2012 09:00	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	4,5·10 ⁰	<LQ	<LQ	<LQ
	11.10.2012 09:00	4,3·10 ⁰	<LQ	<LQ	<LQ	6,3·10 ⁰	<LQ	<LQ	<LQ
	15.10.2012 11:00	1,2·10 ²	<LQ	<LQ	<LQ	8,7·10 ⁰	<LQ	<LQ	<LQ
	15.10.2012 18:00	7,7·10 ¹	2,5·10 ¹	<LQ	<LQ	8,2·10 ⁰	<LQ	<LQ	<LQ
	16.10.2012 08:00	1,1E+02	<LQ	4,9·10 ⁰	<LQ	5,0·10 ⁰	<LQ	<LQ	<LQ
	16.10.2012 14:00	1,9·10 ²	6,5·10 ⁰	<LQ	<LQ	7,9·10 ⁰	<LQ	<LQ	<LQ
	17.10.2012 10:00	<LQ	<LQ	<LQ	3,3·10 ¹	6,4·10 ⁰	<LQ	<LQ	<LQ
	17.10.2012 16:00	2,2·10 ¹	<LQ	<LQ	<LQ	1,0·10 ¹	<LQ	<LQ	<LQ
	17.10.2012 23:00	1,6·10 ¹	<LQ	<LQ	9,4·10 ¹	7,6·10 ²	<LQ	<LQ	<LQ
	18.10.2012 04:00	3,3·10 ¹	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	18.10.2012 09:00	9,3·10 ⁰	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	20.10.2012 16:00	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	21.10.2012 15:00	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	23.10.2012 09:00	6,3·10 ⁰	4,0·10 ⁰	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	06.11.2012 09:00	1,2·10 ³	6,2·10 ⁰	2,8·10 ¹	<LQ	1,2·10 ¹	<LQ	<LQ	<LQ
	13.11.2012 09:00	3,3·10 ³	<LQ	1,5·10 ²	5,8·10 ⁰	7,3·10 ⁰	<LQ	<LQ	<LQ
	20.11.2012 09:00	9,8·10 ⁰	1,7·10 ¹	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	27.11.2012 09:00	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	04.12.2012 09:00	1,5·10 ²	<LQ	<LQ	<LQ	1,1·10 ¹	<LQ	<LQ	<LQ
	18.12.2012 09:00	2,1·10 ³	1,1·10 ²	<LQ	<LQ	9,2·10 ⁰	<LQ	<LQ	<LQ
06.01.2013 09:00	4,0·10 ¹	7,3·10 ¹	<LQ	<LQ	1,0·10 ³	<LQ	<LQ	<LQ	
14.01.2013 09:00	1,3·10 ¹	5,7·10 ⁰	<LQ	4,2·10 ⁰	6,5·10 ⁰	<LQ	<LQ	<LQ	
22.01.2013 09:00	5,5·10 ⁰	9,1·10 ⁰	<LQ	<LQ	4,9·10 ¹	<LQ	<LQ	<LQ	
05.02.2013 09:00	5,4·10 ²	3,9·10 ²	4,8·10 ⁰	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
12.02.2013 09:00	4,2·10 ⁰	<LQ	<LQ	<LQ	1,1·10 ¹	<LQ	<LQ	<LQ	
19.02.2013 09:00	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
26.02.2013 09:00	n,a	<LQ	5,4·10 ⁰	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
05.03.2013 09:00	6,7·10 ²	<LQ	5,2·10 ⁰	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
12.03.2013 09:00	5,8·10 ¹	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	2,9E+01	<LQ	
19.03.2013 09:00	4,0·10 ¹	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
26.03.2013 09:00	1,1·10 ¹	<LQ	<LQ	<LQ	8,1·10 ⁰	<LQ	<LQ	<LQ	
02.04.2013 09:00	6,5·10 ¹	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
09.04.2013 09:00	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,6·10 ¹	<LQ	<LQ	<LQ	
16.04.2013 09:00	1,8·10 ¹	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
23.04.2013 09:00	4,6·10 ²	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
14.05.2013 09:00	<LQ	<LQ	1,9·10 ¹	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
31.05.2013 11:00	4,9·10 ⁰	<LQ	<LQ	<LQ	4,9E+00	<LQ	<LQ	<LQ	
31.05.2013 18:00	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	

Tabelle 10.14: Darstellung der quantitativen Ergebnisse der Untersuchung der Gallusquelle auf wirtsunspezifische und spezifische *Bacteroides* sowie mtDNA-Sequenzen für den Zeitraum Juni-Juli 2013 (LQ: Limit of Quantification).

Probennahme	<i>Bacteroides</i> -Marker				mtDNA-Marker			
	Wirts- unspezi- fisch	Mensch	Wieder- käufer	Art- unspezi- fisch	Mensch	Rind	Huhn	Pferd
	pro mL							
01.06.2013 01:00	$8,2 \cdot 10^1$	<LQ	<LQ	<LQ	$1,2 \cdot 10^1$	<LQ	<LQ	<LQ
01.06.2013 12:00	$5,7 \cdot 10^2$	$3,5 \cdot 10^2$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
01.06.2013 15:00	$7,8 \cdot 10^2$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
01.06.2013 18:00	$5,9 \cdot 10^3$	$6,8 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	$6,0 \cdot 10^1$	<LQ	<LQ	<LQ
01.06.2013 21:00	$1,4 \cdot 10^4$	$7,0 \cdot 10^2$	<LQ	<LQ	$5,5 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	<LQ
02.06.2013 00:00	$1,3 \cdot 10^4$	$5,8 \cdot 10^2$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
02.06.2013 03:00	$9,7 \cdot 10^3$	$4,5 \cdot 10^2$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
02.06.2013 06:00	$1,1 \cdot 10^4$	$6,9 \cdot 10^2$	<LQ	$6,7 \cdot 10^0$	$1,2 \cdot 10^1$	<LQ	<LQ	<LQ
02.06.2013 09:00	$6,6 \cdot 10^3$	$4,3 \cdot 10^2$	<LQ	$5,9 \cdot 10^0$	$9,5 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	<LQ
02.06.2013 12:00	$4,2 \cdot 10^3$	$2,2 \cdot 10^2$	<LQ	$8,7 \cdot 10^0$	$6,2 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	<LQ
02.06.2013 15:00	$3,7 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^2$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
02.06.2013 18:00	$5,6 \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^2$	<LQ	<LQ	$6,2 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	<LQ
02.06.2013 21:00	$5,8 \cdot 10^3$	$2,7 \cdot 10^2$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
03.06.2013 00:00	$6,2 \cdot 10^3$	$3,1 \cdot 10^2$	<LQ	$6,4 \cdot 10^0$	$1,2 \cdot 10^2$	<LQ	<LQ	<LQ
03.06.2013 03:00	$4,8 \cdot 10^3$	$2,7 \cdot 10^2$	<LQ	<LQ	$6,3 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	<LQ
03.06.2013 06:00	$1,8 \cdot 10^3$	$9,5 \cdot 10^1$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
03.06.2013 09:00	$2,0 \cdot 10^3$	$9,6 \cdot 10^1$	<LQ	$1,8 \cdot 10^1$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
03.06.2013 12:00	$1,4 \cdot 10^3$	$6,1 \cdot 10^1$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
03.06.2013 15:00	$7,3 \cdot 10^2$	$2,9 \cdot 10^1$	<LQ	$5,7 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
03.06.2013 18:00	$1,2 \cdot 10^4$	$3,4 \cdot 10^1$	<LQ	$6,5 \cdot 10^0$	$1,3 \cdot 10^1$	<LQ	<LQ	<LQ
03.06.2013 21:00	$1,2 \cdot 10^2$	$5,8 \cdot 10^1$	<LQ	$8,5 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
04.06.2013 00:00	$1,0 \cdot 10^3$	$5,4 \cdot 10^1$	<LQ	<LQ	$5,8 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	<LQ
04.06.2013 03:00	$1,1 \cdot 10^3$	$5,5 \cdot 10^1$	<LQ	$6,6 \cdot 10^0$	$2,4 \cdot 10^2$	<LQ	<LQ	<LQ
04.06.2013 06:00	$1,2 \cdot 10^3$	$7,3 \cdot 10^1$	<LQ	$4,1 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
04.06.2013 10:00	$8,5 \cdot 10^2$	$5,6 \cdot 10^1$	<LQ	$6,8 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
04.06.2013 12:00	$1,1 \cdot 10^3$	$7,2 \cdot 10^1$	<LQ	$9,0 \cdot 10^0$	$1,9 \cdot 10^1$	<LQ	<LQ	<LQ
04.06.2013 15:00	$1,3 \cdot 10^3$	$7,2 \cdot 10^1$	<LQ	$1,0 \cdot 10^2$	$4,4 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	<LQ
04.06.2013 18:00	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
05.06.2013 00:00	$5,1 \cdot 10^2$	$3,9 \cdot 10^1$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
05.06.2013 06:00	$6,7 \cdot 10^2$	$2,7 \cdot 10^1$	<LQ	$4,7 \cdot 10^0$	$8,5 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	<LQ
05.06.2013 12:00	$6,3 \cdot 10^2$	$3,8 \cdot 10^1$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
05.06.2013 18:00	$3,4 \cdot 10^2$	$1,9 \cdot 10^1$	<LQ	<LQ	$1,0 \cdot 10^1$	<LQ	<LQ	<LQ
06.06.2013 00:00	$5,6 \cdot 10^2$	$1,6 \cdot 10^1$	<LQ	$1,2 \cdot 10^1$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
06.06.2013 06:00	$4,1 \cdot 10^2$	<LQ	<LQ	<LQ	$1,4 \cdot 10^1$	<LQ	<LQ	<LQ
06.06.2013 12:00	$3,0 \cdot 10^2$	$8,4 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
18.06.2013 09:00	$1,1 \cdot 10^1$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
25.06.2013 09:00	$6,3 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
02.07.2013 09:00	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	$4,6 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	<LQ
09.07.2013 09:00	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	$6,6 \cdot 10^0$	<LQ	<LQ	<LQ
16.07.2013 09:00	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ

Ereignis C: Hochwasser

Tabelle 10.15: Antibiotikaresistenzgene im Tai-See im Vergleich mit anderen chinesischen und internationalen Oberflächengewässern. Relative Abundanz ist die Kopienzahl der Antibiotikaresistenzgene normalisiert durch die 16S rRNA Genkopien. (LOQ = limit of quantification, Bestimmungsgrenze).

	Gen	Untersuchungsgebiet(e)	Referenz	Bereich der absoluten Abundanz pro mL or g	Bereich der relativen Abundanz
Wasser	<i>sul1</i>	Tai-See, China	diese Studie	10^3 - 10^5	10^{-4} - 10^{-2}
		Städtische Seen, China	Yang et al., 2017c	-	10^{-3} - 10^{-2}
		Seen im Einzugsbereich des Yangtze, China	Yang et al., 2017b	-	10^{-2} - 10^{-2}
		21 Seen, Schweiz	Czekalski et al., 2015	-	10^{-3} - 10^{-1}
		Boston-See, China	Zhou et al., 2014	-	10^{-5} - 10^{-3}
		Fluss Liuxi, China	Xiong et al., 2014	-	10^{-3} - 10^{-2}
		Wasserreservoir im Jinjinj-Gebiet, China	Zhang et al., 2017	-	10^{-5} - 10^{-3}
		Fluss Haihe, China	Luo et al., 2010	10^4 - 10^6	10^{-4} - 10^{-1}
		Fluss Huangpu, China	Jiang et al., 2013	10^4 - 10^5	
	<i>bla</i> _{TEM}	Tai-See, China	diese Studie	< LOQ- 10^4	10^{-7} - 10^{-3}
		Fluss Huangpu, China	Jiang et al., 2013	10^3 - 10^4	
	<i>bla</i> _{NDM-1}	Tai-See, China	diese Studie	< LOQ	10^{-7} - 10^{-4}
		Ganges und Fluss Yamuna, Indien	Ahammad et al., 2014	10^1 - 10^7	-
	<i>mcr-1</i>	Tai Lake, China	diese Studie	< LOQ	-
		Fluss Haihe, China	Yang et al., 2017a	10^3 - 10^5	
Sediment	<i>sul1</i>	Tai-See, China	diese Studie	10^4 - 10^8	10^{-5} - 10^{-2}
		Fluss Haihe, China	Luo et al., 2010	10^8 - 10^9	10^{-4} - 10^{-2}
		Wasserreservoirs im Jinjinj-Gebiet, China	Zhang et al., 2017	-	10^{-5} - 10^{-3}
	<i>bla</i> _{TEM}	Tai-See, China	diese Studie	< LOQ- 10^7	10^{-6} - 10^{-2}
		Genfer See, Schweiz	Devarajan et al., 2015		10^{-5} - 10^{-3}
	<i>bla</i> _{NDM-1}	Tai-See, China	diese Studie	< LOQ- 10^5	10^{-5} - 10^{-4}
		Genfer See, Schweiz	Devarajan et al., 2015		10^{-6} - 10^{-6}
		Ganges und Fluss Yamuna River, Indien	Ahammad et al., 2014	10^3 - 10^5	-

